

Universität Ulm

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

Internalisierung biotinylierter Proteine in das Zytosol von J774A.1 Makrophagen mithilfe des Streptavidin-C3Mut Transportsystems

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

Alexander Michael Sold
geboren in Aalen

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Knöll

Tag der Promotion: 29.10.2015

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Hannes Christow, Maren Lillich, **Alexander Sold**, Jörg Fahrer, Holger Barth
Recombinant streptavidin-C3bot for delivery of proteins into macrophages.
Toxicon 75: 144–147 (2013)

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	III
1.	Einleitung.....	1
1.1	Bakterielle Toxine	1
1.2	AB-Toxine.....	1
1.3	C3-Exoenzyme	2
1.3.1	Struktur und Wirkungsweise der C3-Exoenzyme am Beispiel des C3bot von Clostridium botulinum.....	3
1.3.2	Zelluläre Aufnahme und pathophysiologische Rolle von C3-Exoenzymen	5
1.4	Das Streptavidin-C3Mut Transportkonstrukt	6
1.5	Cargo Proteine, die über das Streptavidin-C3Mut Transportsystem in J774A.1 Makrophagen transportiert werden sollen.....	8
1.5.1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1).....	8
1.5.2	Das katalytisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins (DTA)	9
1.6	Zielsetzung	10
2.	Material und Methoden.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Chemikalien.....	12
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.4	Proteine	14
2.1.5	Antikörper	15
2.1.6	Prokaryotische Zelllinien.....	15
2.1.7	Eukaryotische Zelllinien.....	16
2.1.8	Häufig verwendete Puffer.....	16
2.1.9	Kits	17
2.1.10	Molekulargewichtsmarker	17

2.2 Methoden	17
2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	17
2.2.2 Färbung von Proteinen mittels Coomassie Blue	19
2.2.3 Western Blot.....	19
2.2.4 Strippen von Western Blots.....	21
2.2.5 Dot Blot	21
2.2.6 Zellkultur	22
2.2.7 MTS-Assay.....	22
2.2.8 Statistische Auswertung des MTS-Assays	23
2.2.9 Digitonin-Assay.....	23
2.2.10 Biotinylierung von PARP-1	24
2.2.11 Aufreinigung des Streptavidin-C3Mut Fusionsproteins.....	25
3. Ergebnisse	28
3.1 Aufreinigung des Streptavidin-C3Mut Transporterproteins	28
3.2 Biotinylierung von Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP).....	29
3.3 Dot Blot Analyse der Interaktion von biotinylierter Poly (ADP-Ribose) Polymerase und Streptavidin-C3Mut	30
3.4 Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von J774A.1 Zellen.....	33
3.4.1 Internalisierung von biotinylierter PARP	33
3.4.2 Internalisierung von biotinyliertem DTA.....	37
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	48
III. Danksagung.....	V
IV. Lebenslauf.....	VI

II. Abkürzungsverzeichnis

- **ADP** Adenosindiphosphat
- **AG** Arbeitsgruppe
- **AIF** Apoptose-induzierender Faktor
- **AK** Antikörper
- **AML** Akute Myeloische Leukämie
- **APS** Ammoniumpersulfat
- **Arf** Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
- **ARTT-Motiv** *ADP-ribosyl-turn-turn*-Motiv
- **ATP** Adenosintriphosphat
- **bDTA** biotinyliertes A-Fragment des Diphtherie-Toxins
- **bide** zweifach destilliert
- **bPARP** biotinylierte Poly (ADP-Ribose) Polymerase
- **BSA** *Bovine Serum Albumin* (engl) Serumalbumin des Rinds
- **C2** C2-Toxin von *Clostridium botulinum*
- **C2Iia** aktivierte Transportkomponente des C2-Toxins
- **C2IN** Amino-terminales Ende der Enzymkomponente des C2-Toxins
- **C3bot** C3 Exoenzym von *Clostridium botulinum*
- **C3cer** C3 Exoenzym von *Bacillus cereus*
- **C3lim** C3 Exoenzym von *Clostridium limosum*
- **C3Mut** enzymatisch inaktives C3bot1E174Q Protein
- **C3stau** C3 Exoenzym von *Staphylococcus aureus*
- **Cdc 42** *Cell Division Control Protein 42*
- **C-Terminus** Carboxy-terminales Ende
- **DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO** Dimethylsulfoxid
- **DNA** Desoxyribonukleinsäure
- **DT** Diphtherie-Toxin
- **DTA** katalytisch aktives A-Fragment des Diphtherie-Toxins
- **DTT** 1,4-Dithiothreitol
- **ECL** *Enhanced Chemiluminescence*
- **EDIN** *Epidermal Cell Differentiation Inhibitor*
- **EDTA** Ethylendiamintetraacetat
- **EEA-1** *Early Endosomal Antigen-1*
- **EF-2** Elongationsfaktor 2
- **FCS** *fetal calf serum* (engl) fötales Kälberserum
- **GAP** *GTPase Activating Protein*
- **GDI** *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor*
- **GDP** Guanosindiphosphat
- **GEF** *Guanine Nucleotide Exchange Factor*
- **Glu** Glutamat
- **GST** Glutathion-S-Transferase
- **GTP** Guanosintriphosphat
- **HEPES** 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
- **HSP 90** Hitzeschockprotein 90
- **IgG** Immunglobulin G
- **IPTG** Isopropyl-1-Thio- α -D-Galaktopyranosid

- **kDa** kilo Dalton
- **LB** Luria Bertani
- **LDL** *Low Density Lipoprotein*
- **min** Minute
- **MTS** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
- **NAD** Nikotinamidadenindinukleotid
- **NADP** Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
- **nm** Nanometer
- **N-Terminus** Amino-terminales Ende
- **PAGE** Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- **PAR** Poly ADP-Ribose
- **PARP** Poly (ADP-Ribose) Polymerase
- **PBS** *Phosphate Buffered Saline*
- **PBST** *Phosphate Buffered Saline-tween*
- **PES** Phenazin Ethosulfat
- **PMSF** Phenylmethylsulfonylfluorid
- **Rab** *Ras related in brain* Protein
- **Ran** *Ras related nuclear* Protein
- **Ras** *Rat sarcoma* Protein
- **Rho** Ras homologes Protein
- **RNase A** Ribonuclease A
- **RT** Raumtemperatur
- **SDS** Natriumdodecylsulfat
- **StrepPOD** Streptavidin-Peroxidase
- **STS-Motiv** Serin-Threonin-Serin-Motiv
- **Stv** Streptavidin
- **Stv-C3Mut** Fusionsprotein aus Streptavidin und enzymatisch inaktivem C3bot1E174Q
- **TEMED** N, N, N, N'-Tetramethylethylendiamin
- **Tris** Trishydroxymethylaminomethan

1. Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine

Bakterielle Exotoxine sind als Pathogenitätsfaktoren für die Entstehung einer Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Tetanus, Diphtherie oder Keuchhusten, verantwortlich.

Exotoxine sind Proteine, die von intakten Bakterien sezerniert werden. Sie können, entsprechend ihrer Wirkweise, in Membran schädigende und intrazellulär wirkende Toxine eingeteilt werden (Middlebrook und Dorland 1984). Ein Beispiel für ein Membran schädigendes Toxin ist das α -Toxin von *Clostridium perfringens*, das erste bakterielle Toxin, das als Enzym identifiziert werden konnte (Macfarlane und Knight 1941). Es gilt als wichtigster Virulenzfaktor bei dem durch *Clostridium perfringens* verursachten Gasbrand. Das Toxin zeigt sowohl Eigenschaften einer Phospholipase, als auch einer Sphingomyelinase, wodurch es die Bildung von Poren und damit die Zerstörung der Zellmembranen verursacht, was schließlich zur Nekrose des betroffenen Gewebes führt (Sakurai et al. 2004).

Intrazellulär wirkende Exotoxine sind ebenfalls Enzyme, welche ihre enzymatische Aktivität jedoch erst nach dem Transport in das Zytosol entfalten. Sie binden typischerweise an Rezeptoren an der Zelloberfläche und werden dadurch spezifisch in bestimmte Zielzellen aufgenommen. Darüber hinaus zeigen diese Toxine in ihrer enzymatischen Aktivität eine hohe Substratspezifität. Beispiele für intrazellulär wirkende Exotoxine sind das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* und das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Diphtherie-Toxin (DT) von *Corynebacterium diphtheriae*. Beide gehören zu der Untergruppe der sogenannten AB-Toxine, deren Struktur und Wirkungsweise im folgenden Abschnitt 1.2 näher erläutert werden.

1.2 AB-Toxine

Die Gruppe der bakteriellen AB-Toxine weist eine charakteristische Struktur auf. Die Toxine bestehen aus zwei funktionell verschiedenen Domänen. Dabei ist die A-Domäne die enzymatisch aktive Domäne, welche nach dem Transport in das Zytosol das jeweils

spezifische Zielprotein modifiziert. Die B-Domäne ist für die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die anschließende Translokation in das Zellinnere verantwortlich. Die beiden Domänen können gemeinsam auf einem Protein lokalisiert sein. Diese Toxine werden dann als einkettige AB-Toxine bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist das Diphtherie-Toxin (Collier 1975). Liegen die beiden Domänen auf zwei verschiedenen, voneinander getrennten Proteinen, werden diese Toxine als binäre AB-Toxine, die beiden Proteine als Komponenten bezeichnet. Zu den binären AB-Toxinen gehört beispielsweise das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Barth et al. 2004).

Darüber hinaus können AB-Toxine entsprechend ihrem Transportweg bei der Aufnahme in Zellen eingeteilt werden. Bei den sogenannten „short trip“ Toxinen translozieren die enzymatisch aktiven Domänen nach rezeptorvermittelter Endozytose aus frühen Endosomen in das Zytosol. Hierzu wird ein niedriger pH-Wert benötigt, welcher zu einer Konformationsänderung der Transportdomänen und deren Insertion in die vesikuläre Membran mit Bildung einer Pore führt. Durch diese Pore gelangt schließlich die Enzymdomäne in das Zytosol. Zu den „short trip“ Toxinen zählen beispielsweise das Diphtherie-Toxin (Sandvig und Olsnes 1980) und das C2-Toxin (Barth et al. 2000). Die „long trip“ AB-Toxine wandern dagegen nach der Endozytose retrograd entlang des Trans-Golgi Netzwerkes und des Golgi Apparates zum Endoplasmatischen Retikulum, wo schließlich die Enzymdomäne in das Zytosol gelangt. Auf diesem Transportweg wird zum Beispiel das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* in das Zytosol der betroffenen Zellen transportiert (Lencer und Tsai 2003).

Viele AB-Toxine entfalten ihre enzymatische Aktivität als ADP-Ribosyltransferasen. Dabei übertragen sie einen ADP-Riboserest von NAD^+ kovalent auf ihr jeweiliges zelluläres Zielprotein. So wird beispielsweise der Elongationsfaktor-2 (EF-2) durch das Diphtherie-Toxin ADP-ribosyliert und dadurch inaktiviert (Collier 1975).

1.3 C3-Exoenzyme

Bei den C3-Exoenzymen handelt es sich um eine Gruppe von ADP-Ribosyltransferasen, welche die mono-ADP-Ribosylierung der kleinen GTPasen Rho A, B und C katalysieren (Vogelsgesang et al. 2007). Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität waren die C3-Proteine in den vergangenen Jahren ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der Funktion und

Wirkungsweise der Rho-GTPasen. Als erster Vertreter wurde C3bot1 von *Clostridium botulinum* beschrieben (Aktories et al. 1987), wovon in dieser Arbeit die inaktive Mutante E174Q (Böhmer et al. 1996) verwendet wurde.

Insgesamt wurden bislang sieben verschiedene C3-Proteine mit einer zu 35 % bis 75 % identischen Aminosäuresequenz beschrieben, wobei allesamt von Gram-positiven Bakterien produziert werden. Zu ihnen gehören neben C3bot1, C3bot2 von *Clostridium botulinum* (Nemoto et al. 1991), C3cer von *Bacillus cereus* (Just et al. 1992b), C3stau1, 2 und 3 (ursprünglich als EDIN bezeichnet) von *Staphylococcus aureus* (Inoue et al. 1991; Wilde et al. 2001; Yamaguchi et al. 2001) und C3lim von *Clostridium limosum* (Just et al. 1992a).

1.3.1 Struktur und Wirkungsweise der C3-Exoenzyme am Beispiel des C3bot von *Clostridium botulinum*

Das C3bot-Protein von *Clostridium botulinum* ist, wie auch die anderen C3-Exoenzyme, ein einkettiges Polypeptid und weist ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa auf (Aktories et al. 2004). Es werden zwei Isoformen, C3bot1 und C3bot2 produziert, welche eine zu 65 % identische Aminosäuresequenz besitzen (Nemoto et al. 1991).

C3bot1 wird mit einem N-terminalen Signalpeptid, bestehend aus 40 Aminosäureresten, produziert. Das reife Protein besteht schließlich aus 211 Aminosäuren (Popoff et al. 1991). Im Jahr 2001 wurde von Han et al. erstmals die Kristallstruktur von C3bot aufgeklärt. Das Protein besteht aus einem aus 5 Strängen bestehenden, gemischt verknüpftem β -Faltblatt und einem aus 3 Strängen bestehenden, antiparallel angeordneten β -Faltblatt. Beide Faltblätter bilden durch orthogonale Anordnung ein „ β -Sandwich“ und sind von insgesamt 5 α -Helices umgeben (Han et al. 2001).

Das katalytische Zentrum von C3bot weist diverse konservierte Aminosäuresequenzmotive auf, die auch in anderen ADP-ribosylierenden Toxinen zu finden sind. Eines dieser Motive ist beispielsweise das STS-Motiv (in C3bot1: Serin134-Threonin135-Serin136). Dieses ist zum einen an der Bildung der NAD⁺ Bindestelle beteiligt, zum anderen bildet der erste Serinrest Wasserstoffbrücken zu der katalytischen Aminosäure Glutamat (in C3bot1: Glu174) und trägt so zu deren korrekter Positionierung innerhalb des katalytischen Zentrums bei (Han et al. 2001). Ein weiteres Motiv ist das ARTT (ADP-ribosyl-turn-turn)

Motiv, in welchem die katalytische Aminosäure Glutamat enthalten ist und welches in die Erkennung der Substrate NAD^+ und Rho involviert ist (Han et al. 2001).

Die Rho-Proteine gehören neben Ras, Rab, Arf und Ran zur Familie der kleinen GTPasen. Die Familie der Rho-GTPasen besteht ihrerseits aus 6 Unterfamilien (Bustelo et al. 2007), von denen Rho, Rac und Cdc42 zu den am besten charakterisierten gehören. Sie sind wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts und als solche unter anderem an der Regulation von vesikulären Transportprozessen, der Zellteilung und der Etablierung der Polarität von Zellen beteiligt (Etienne-Manneville und Hall 2002). Die Rho-GTPasen werden durch die Bindung von GTP aktiviert. Die Hydrolyse von GTP zu GDP führt dagegen zur Inaktivierung von Rho. Die Bindung von GTP oder GDP hängt von verschiedenen regulierenden Proteinen ab (Abbildung 1). So katalysieren die GEFs (guanine nucleotide exchange factors) den Austausch von GDP durch GTP und damit die Aktivierung von Rho (Schmidt und Hall 2002). Die GAPs (GTPase activating proteins) stimulieren die Hydrolyse von GTP und unterstützen somit die Inaktivierung von Rho (Lamarche und Hall 1994). Die dritte wichtige Gruppe von Regulatorproteinen sind die GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors). Diese bilden einen Komplex mit den GDP gebundenen Rho-Proteinen und verhindern sowohl den Austausch von Nukleotiden als auch die Bindung von Substraten, wodurch Rho in einem inaktiven Zustand verbleibt (Olofsson 1999).

Wie auch die übrigen C3-Exoenzyme ADP-ribosyliert C3bot spezifisch Rho A, B und C an einem Asparaginrest (in Rho A beispielsweise Asparagin 41) (Sekine et al. 1989). Andere Mitglieder der Rho Familie wie Rac oder Cdc42 stellen nur in sehr geringem Maße Substrate von C3 Exoenzymen dar (Just et al. 1992a). Die Übertragung des ADP-Riboserestes von NAD^+ führt zu einem dazu, dass Rho in dem Komplex mit den GDIs gebunden bleibt (Fuijehara et al. 1997; Genth et al. 2003), zum anderen kommt es zu der Blockierung des durch die GEFs vermittelten Austausches von GDP zu GTP (Sehr et al. 1998). Beides resultiert in der Inaktivierung von Rho (Abbildung 1). Dies führt schließlich zu einer Umverteilung und Depolymerisation von Aktinfilamenten mit konsekutiven morphologischen Veränderungen wie der Abrundung von Zellen oder der Ausbildung von Protrusionen (Chardin et al. 1989; Paterson et al. 1990). Als Folge werden außerdem verschiedene Rho-abhängige zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Zelladhäsion, die Endozytose oder auch die Progression des Zellzyklus, gehemmt (Vogelsgesang et al. 2007).

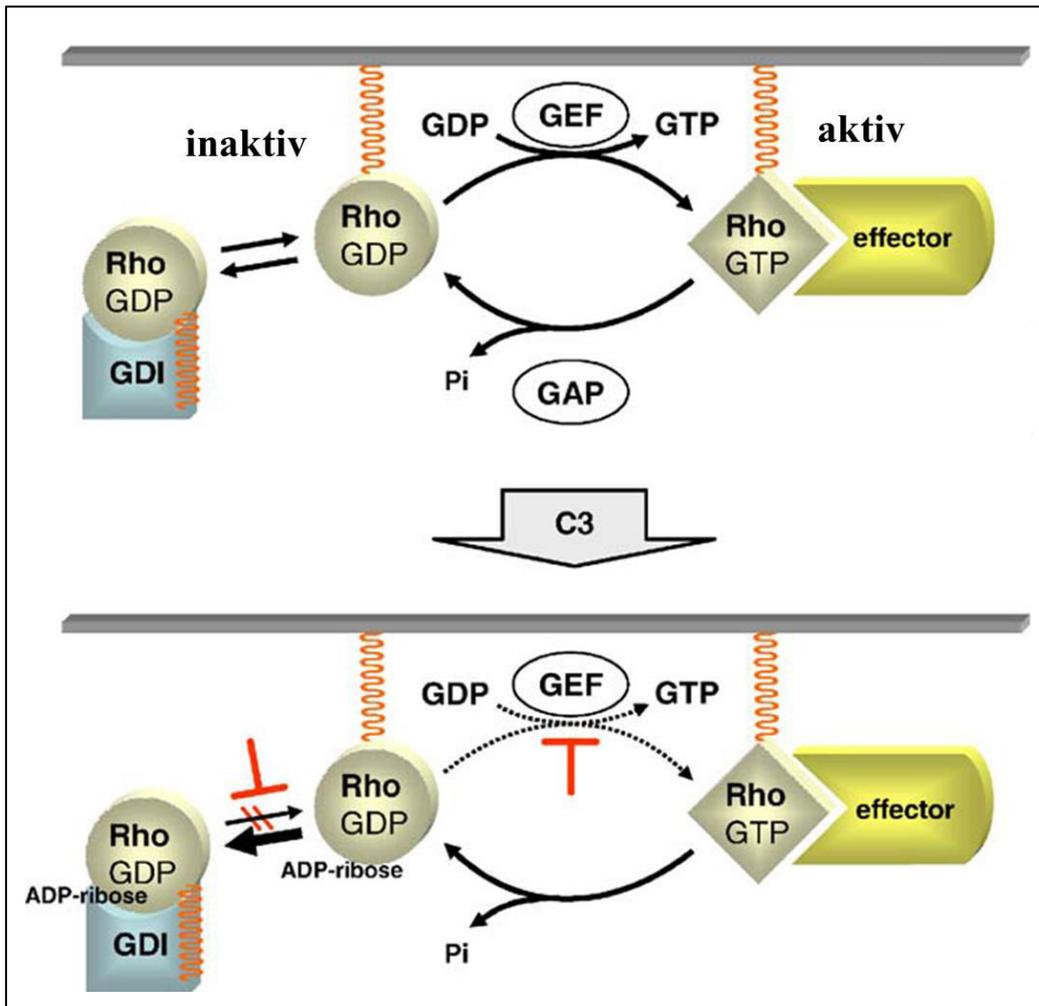


Abbildung 1: Regulierung der Rho-GTPasen und der Effekt von C3-Exoenzymen (modifiziert nach Vogelsang et al. 2007 mit freundlicher Erlaubnis von Springer Science and Business Media). Im GDP gebundenen Zustand ist Rho inaktiv, durch die Bindung von GTP wird Rho aktiviert. Der GEF (guanine nucleotide exchange factor) katalysiert den Austausch von GDP zu GTP. GAP (GTPase activating protein) katalysiert die Hydrolyse von GTP und damit die Inaktivierung von Rho. Der GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) bildet einen Komplex mit inaktivem Rho-GDP, wodurch Nukleotid-Austausch und Substratbindung blockiert werden. Die ADP-Ribosylierung durch C3 bindet Rho-GDP im Komplex mit GDI und verhindert den Nukleotid-Austausch durch den GEF. (GDP = Guanosindiphosphat; GTP = Guanosintriphosphat)

1.3.2 Zelluläre Aufnahme und pathophysiologische Rolle von C3-Exoenzymen

Die pathophysiologische Rolle der C3-Exoenzyme ist noch zu weiten Teilen unbekannt. Aufgrund der nur schwachen Aufnahme in das Zytosol vieler unterschiedlicher Zelltypen ging man lange Zeit davon aus, dass sie über eher ineffiziente, unspezifische

Aufnahmemechanismen wie die Pinozytose in Zellen gelangen (Aktories et al. 2004). Im Jahr 2010 konnte von Mitarbeitern der AG Barth jedoch gezeigt werden, dass C3bot1 und C3lim spezifisch in J774A.1 Makrophagen und HL-60 Monozyten aufgenommen werden und dort zu einer Inaktivierung von Rho mit entsprechenden morphologischen Veränderungen führen (Fahrer et al. 2010a). Dabei wird das C3-Toxin endozytotisch aufgenommen und transloziert bei niedrigem pH-Wert aus endosomalen Vesikeln in das Zytosol der J774A.1 Zellen (Fahrer et al. 2010a). Dieser Mechanismus ähnelt stark dem der short trip AB-Toxine (s.o.) wie beispielsweise dem C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Barth et al. 2000). Trotz dieser Ergebnisse konnte bisher jedoch weder eine B-Domäne im Sinne der AB-Toxine noch ein bestimmter Rezeptor für die Aufnahme von C3-Toxinen identifiziert werden. In neuen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Bindungspartner von C3 auf der Oberfläche von J774A.1 Makrophagen ein Protein ist und dessen posttranslationale Modifizierung entscheidenden Einfluss auf die Bindung von C3-Exoenzymen hat (Rohrbeck et al. 2014b). So führt beispielsweise die Dephosphorylisierung von Membranproteinen zu einer verminderten Bindung von C3, was im Umkehrschluss die wichtige Rolle von Phosphatgruppen bei der Bindung von C3 an die Zelloberfläche demonstriert (Rohrbeck et al. 2014b).

Die durch C3 hervorgerufene Inaktivierung der Rho-Signaltransduktion führt in Makrophagen zu einer deutlichen Hemmung der Phagozytose (Caron und Hall 1998). Daher wäre es denkbar, dass C3-Toxine im Rahmen einer Infektion mit dem jeweils produzierenden Bakterium auf diese Weise das angeborene Immunsystem hemmen und die Bakterien vor diesem schützen (Fahrer et al. 2010a).

1.4 Das Streptavidin-C3Mut Transportkonstrukt

Um Proteine in Zellen einzuschleusen, werden seit einigen Jahren binäre AB-Toxine als Transportsysteme verwendet. Als Prototyp gilt hierbei das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Barth et al. 2002). Ein Beispiel für ein C2-Toxin-basiertes Transportsystem ist das C2IN-Streptavidin Fusionsprotein, das den Transport biotinylierter Moleküle in das Zytosol verschiedener eukaryotischer Zellen vermittelt (Fahrer et al. 2010b; Fahrer et al. 2010c).

Nach diesem Vorbild wurde ein C3-basiertes Fusionsprotein geschaffen, um biotinylierte Proteine selektiv in Makrophagen zu transportieren. Dieses Transportsystem besteht aus

der enzymatisch inaktiven Mutante C3bot1E174Q (C3Mut) (Böhmer et al. 1996) und Streptavidin. Ebenso wie wildtypisches C3bot1 wird auch C3Mut spezifisch in Makrophagen und Monozyten aufgenommen. Es zeigt jedoch keine Auswirkungen auf die Aktivität der Rho GTPasen und folglich auch nicht auf die Zellmorphologie (Böhmer et al. 1996; Fahrer et al. 2010a). Streptavidin ist ein von *Streptomyces avidinii* produziertes Protein mit sehr hoher Affinität für Biotin und ist außerordentlich stabil gegenüber Hitze oder extremen pH-Werten (Laitinen et al. 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde Streptavidin bereits als Bestandteil anderer Transportsysteme verwendet. Ein Beispiel ist die gentechnische Fusionierung von Streptavidin und einem monoklonalen Antikörper gegen den Transferrinrezeptor, womit biotinylierte Wirkstoffe über biologische Membranen wie die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden können (Pardridge 2002). C3Mut und Streptavidin wurden zunächst chemisch über eine Thioetherbindung konjugiert und das Konjugat näher untersucht (Lillich et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Streptavidin-C3Mut (Stv-C3Mut) in J774A.1 Makrophagen aufgenommen wird, ohne dabei die Zellviabilität zu beeinflussen (Lillich et al. 2012). Mithilfe des chemisch konjugierten Transportkonstruktes konnten biotinylierte RNase A sowie biotinyliertes Lysozym erfolgreich in das Zytosol von J774A.1 Zellen transportiert werden (Lillich et al. 2012).

Kürzlich gelang es Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Barth, ein gentechnisch generiertes Stv-C3Mut Fusionsprotein herzustellen, welches ebenfalls in J774A.1 Makrophagen aufgenommen wird und auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Christow et al. 2013) (Abbildung 2). Zur Herstellung wurden die zuvor amplifizierten Gene von C3bot1E174Q und einer Tetramere bildenden Mutante von Streptavidin in das pGEX-2T Plasmid ligiert. Zwischen den beiden Genen wurde eine Linker-Sequenz, die für acht Aminosäuren codiert, eingefügt (Christow et al. 2013). Ein N-terminal liegender GST-tag ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins durch affinitätschromatographische Methoden. Überraschenderweise konnte dieses Transportkonstrukt auch im Zytosol von HeLa Epithelzellen und CHO-K1 Fibroblasten nachgewiesen werden (Lillich et al. 2012; Christow et al. 2013). Diese Veränderung der Zelltyp-Selektivität zeigte auch das chemisch erzeugte Konstrukt und könnte am ehesten durch das konjugierte Streptavidin verursacht werden (Lillich et al. 2012).

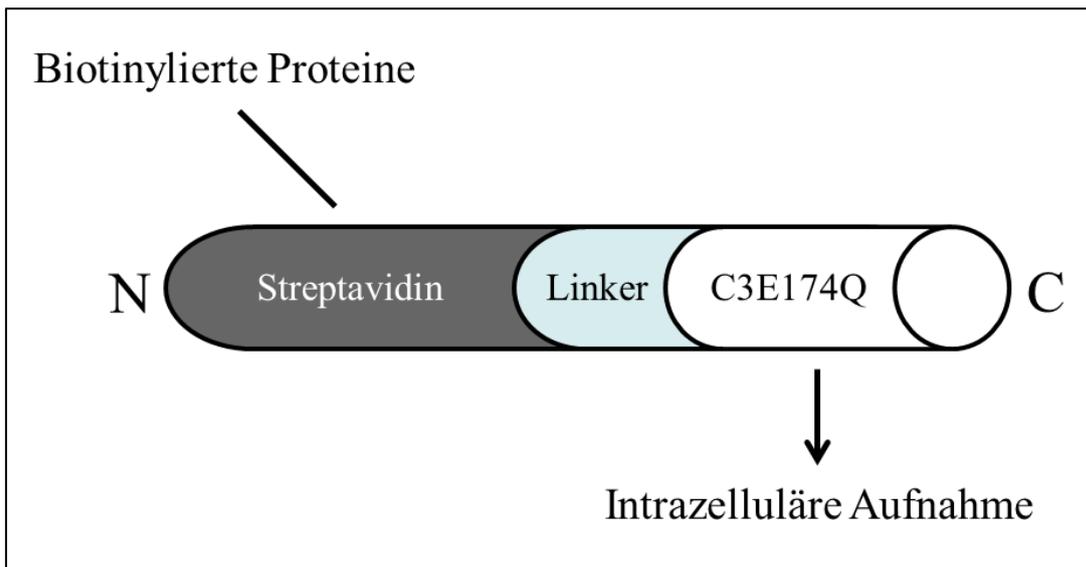


Abbildung 2: Streptavidin-C3Mut Fusionsprotein. Streptavidin ist über einen Linker aus 8 Aminosäuren mit enzymatisch inaktivem C3E174Q verbunden. Biotinylierte Proteine können an Streptavidin gebunden werden. C3E174Q vermittelt die Aufnahme in J774A.1 Makrophagen.

1.5 Cargo Proteine, die über das Streptavidin-C3Mut Transportsystem in J774A.1 Makrophagen transportiert werden sollen

Um den Transport biotinylierter Proteine mithilfe des Streptavidin-C3Mut Transportsystems näher zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Proteine als „Fracht“ (Cargo) verwendet.

1.5.1 Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1)

PARP-1 ist ein hochgradig konserviertes, ubiquitär vorkommendes, nukleäres Protein mit einer Masse von ca. 116 kDa (Krishnakumar und Kraus 2010). Es besteht aus einer N-terminalen DNA-Bindungsdomäne, einer zentral gelegenen Automodifikationsdomäne und der C-terminal gelegenen katalytischen Domäne. Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne vermitteln zwei Zinkfinger die Bindung des Enzyms an die DNA (D'Amours et al. 1999). Dabei vermag PARP-1 an verschiedene Strukturen der DNA, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche oder spezifische DNA-Sequenzen, aber auch an andere Chromatin-Strukturen wie Histone, zu binden (Kraus 2008; Kim et al. 2004). Über die

Automodifikationsdomäne werden Interaktionen mit anderen Proteinen, wie beispielsweise mit DNA-Reparatur Enzymen, vermittelt (Krishnakumar und Kraus 2010). PARP-1 katalysiert die Modifizierung von Proteinen durch die NAD^+ abhängige Bindung und Polymerisation von ADP-Riboseresten, wobei das negativ geladene Polymer Poly ADP-Ribose oder PAR entsteht (D'Amours et al. 1999). Entsprechend der vielen unterschiedlichen Funktionen, die PARP-1 im Zellkern übernimmt, sind eine Reihe verschiedener Zielproteine bekannt. Besonders ausführlich erforscht ist die Rolle von PARP-1 in der Reparatur von DNA-Schäden. Es wird angenommen, dass PARP-1 an beschädigte DNA bindet und dadurch aktiviert wird. Das Enzym modifiziert daraufhin weitere Proteine, die für einen Arrest des Zellzyklus sorgen oder direkt an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Bouchard et al. 2003). Im Falle einer besonders schweren Schädigung der DNA vermag PARP-1 darüber hinaus den Zelltod der betroffenen Zelle zu fördern. Eine solche schwere Schädigung der DNA führt durch die gesteigerte Aktivierung von PARP-1 zu einem hohen Verbrauch an NAD^+ . In der Folge steht NAD^+ unter anderem nicht mehr für die ATP-Synthese zur Verfügung. Der so entstandene ATP-Mangel führt schließlich zur Nekrose der Zelle (Bouchard et al. 2003). Des Weiteren führt der durch PARP-1 entstandene NAD^+ -Mangel zu der Freisetzung des *apoptosis inducing factors* (AIF) aus Mitochondrien und damit schließlich zur Apoptose der betroffenen Zelle (Yu et al. 2002).

Neben der wichtigen Rolle bei der Reaktion auf eine Schädigung der DNA ist PARP-1 noch an einigen weiteren nukleären Prozessen wie der Regulierung der Chromatinstruktur, der Transkription oder der DNA-Methylierung beteiligt (Krishnakumar und Kraus 2010).

1.5.2 Das katalytisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins (DTA)

Das Diphtherie-Toxin (DT) wird von *Corynebacterium diphtheriae* gebildet. Es handelt sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa (Collier 1975), das zu den einkettigen AB-Toxinen gehört. Das C-terminale B-Fragment besteht aus einer Rezeptorbindungsdomäne (R-Domäne) und einer Translokationsdomäne (T-Domäne), das N-terminal gelegene A-Fragment (DTA, 21 kDa) trägt die katalytische C-Domäne (Gill und Pappenheimer 1971; Choe et al. 1992). Nach dem Transport in das Zytosol katalysiert die C-Domäne die NAD^+ abhängige Mono-ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 (EF-2), wodurch es zu einer Hemmung der Proteinsynthese und schließlich zum Tod der

betroffenen Zelle durch Apoptose kommt (Collier 1967; Honjo et al. 1968; Kochi und Collier 1993). Dabei überträgt die C-Domäne des DT einen ADP-Riboserest von NAD⁺ auf ein posttranslational modifiziertes Histidin des EF-2, welches auch als Diphthamid bezeichnet wird (Ness et al. 1980).

1.6 Zielsetzung

In den vergangenen Jahren wurden u.a. in der AG Barth diverse Fusionsproteine generiert, die auf bakteriellen Toxinen basieren. Sie fungieren als molekulare Trojanische Pferde um Peptide oder Proteine in Zellen zu transportieren (für Überblick s. Barth und Stiles 2008). Aufgrund der Spezifität der C3-Exoenzyme für Makrophagen und makrophagenartige Zellen (Fahrer et al. 2010a), ist das Streptavidin-C3Mut Transportkonstrukt besonders interessant. Es bietet die Möglichkeit Proteine oder auch pharmakologische Wirkstoffe gezielt in Zellen dieser Zellreihe einzuschleusen. Damit könnten sich in Zukunft neue Therapiemöglichkeiten für Erkrankungen eröffnen, die von Makrophagen oder Monozyten und ihren Vorläuferzellen verursacht bzw. mitverursacht werden. Dazu gehören maligne Erkrankungen wie beispielsweise verschiedene Subtypen der akuten myeloischen Leukämie (AML) oder auch entzündliche Erkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis. Nachdem in der AG Barth bereits das Streptavidin-C3Mut Fusionsprotein gentechnisch hergestellt und dessen Transport in das Zytosol von J774A.1 Makrophagen nachgewiesen werden konnte (Christow et al. 2013), sollte in der vorliegenden Arbeit nun der Transport von biotinylierten Cargo-Proteinen mithilfe dieses Transportkonstrukts erprobt werden. Dabei wurden PARP-1 und DTA als „Fracht“ verwendet und deren Transport in das Zytosol von J774A.1 Zellen mit unterschiedlichen Methoden untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Axiovert Mikroskop 40 CFL; Zeiss (Jena)

Bio-Dot Dot Blot Apparatur; Bio-Rad (München)

Blotvorrichtung; Peqlab Biotech GmbH (Erlangen)

Brutschrank; Binder (Tuttlingen)

Electrophoresis Power Supply EPS 601; Amersham Bioscience (Freiburg)

Gelkammer; Peqlab Biotech GmbH (Erlangen)

Kamera ProgRes C10 Plus; Jenoptik (Jena)

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

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

MicroCentrifuge 220V; Roth (Karlsruhe)

pH-Meter inoLab pH 720; WTW (Weilheim)

Pipetman Pipetten; Gilson (Limburg-Offheim)

Sonifier B-12; Branson Ultrasonics (Danbury, USA)

Spectro-Photometer DU 640; Beckman (München)

Thermomixer Comfort; Eppendorf (Hamburg)

Überkopfschüttler BioRotator RS-Multi; Böckel (Hamburg)

Waage Kern; Kern&Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)

Wasserbad; Bender & Hobein (Bruchsal)

Wippe Duomax 1030; Heidolph (Schwalbach)

Zellzählkammer; LO LaborOptik (Lancing, UK)

Zentrifuge 5415D; Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge 5417R; Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge J2-HS; Beckman (München)

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid

Agarose

Ampicillin

APS

Bromphenolblau

BSA

Chloramphenicol

Complete

Coomassie Brilliant Blue G250

Coomassie Brilliant Blue R250

Cumarsäure

Digitonin

DMEM

DMSO

DTT

EDTA

Eisessig

Entwickler RTU 60

Essigsäure

Ethanol

Glutathion

Glycerin

Glycin

H₂O₂

HCl

Hefeextrakt

HEPES

IPTG

KCl

KH₂PO₄

Luminol

Methanol

Milchpulver
Na₂HPO₄
NaCl
PMSF
Ponceau S
SDS Pellets
Staurosporin
Sulfo-NHS-Biotin
TEMED
Tris
Triton X-100
Trypton
Tween

Die Chemikalien wurden von den im Folgenden genannten Firmen erstanden:

Adefo (Dietzenbach); AppliCem (Darmstadt); Invitrogen (Karlsruhe); Roche (Mannheim); Merck (Darmstadt); Serva (Heidelberg); Roth (Karlsruhe); VWR Prolabo (Darmstadt); Sigma-Aldrich (Taufkirchen); GIBCO (Karlsruhe)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting Papier; Macherey-Nagel (Düren)
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml); Sarstedt (Nümbrecht)
EppendorfgeläÙe (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml); Eppendorf (Hamburg)
Glutathion Sepharose 4B Beads; Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore (Schwalbach)
Micro Bio-Spin TM Chromatography Columns; BIO-RAD (München)
Nitrozellulose-Transfer-Membran; Whatman (Dassel)
Pipettenspitzen; Sarstedt (Nümbrecht); Greiner BIO-One (Solingen)
Röntgenfilme Cornex 5; AGFA (Köln)
Zellkratzer; Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen und -platten; TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml); TPP (Trasadingen, Schweiz)

2.1.4 Proteine

Tabelle 1: Verwendete fertig aufgereinigte Proteine mit Herkunft

(PARP-1 = Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1; DTA = A-Fragment des Diphtherie Toxins)

Protein	Herkunft
PARP-1	Prof. Alexander Bürkle, Institut für Molekulare Toxikologie, Universität Konstanz
DTA	Prof. R. John Collier, Harvard Medical School, Boston, USA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper mit näherer Beschreibung und Hersteller

(AK = Antikörper; EEA1 = Early Endosomal Antigen 1; HSP 90 = Hitzeschockprotein 90; IgG = Immunglobulin G; PARP = Poly (ADP-Ribose) Polymerase))

Antikörper (AK)	Beschreibung	Herkunft
Anti-C3	Polyklonaler AK aus dem Kaninchen gegen C3botE174Q (C3Mut)	Pineda (Berlin)
Anti-PARP		Prof. Alexander Bürkle, Institut für Molekulare Toxikologie, Universität Konstanz
Anti-EEA1	Polyklonaler AK aus dem Kaninchen gegen menschliches EEA1	Acris Antibodies (Herford)
Anti-HSP90	Monoklonaler AK aus der Maus gegen menschliches HSP90	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Goat anti-mouse IgG	Polyklonaler Zweitantikörper aus der Ziege gegen IgG der Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Streptavidin-Peroxidase		Roche (Mannheim)

2.1.6 Prokaryotische Zelllinien

Escherichia coli, Stamm BL21; Novagene (Madison, USA)

Nährmedium (LB-Medium):

10 g NaCl

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

ad 1 l H₂O bidest.

2.1.7 Eukaryotische Zelllinien

J774A.1: Murine Makrophagenlinie, ATCC-Nummer: TIB-67

Nährmedium:

DMEM + 10 % FCS

4 mM L-Glutamat

1,5 g/l Na-Pyruvat

4,5 g/l Glucose

2.1.8 Häufig verwendete Puffer

Tabelle 3: Bezeichnung und Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer

(PBS = phosphate buffered saline; PBST = PBS mit Tween; Tris = Trishydroxymethylaminomethan; bidest. = doppelt destilliert)

PBS	0,2 g KCl 8 g NaCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ad 1 l H ₂ O bidest. HCl bis pH = 7,4
-----	---

PBST	0,2 g KCl 8 g NaCl 0,1 % Tween 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ad 1 l H ₂ O bidest. HCl bis pH = 7,4
1 M Tris-HCl	121 g Tris ad 1 l H ₂ O bidest. HCl je nach gewünschtem pH zufügen

2.1.9 Kits

- EZ-Link® Sulfo-NHS Biotinylation Kit; Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
- Cell Titer 96® Aqueous One Solution cell proliferation Assay (MTS); Promega (Mannheim)

2.1.10 Molekulargewichtsmarker

- Page Ruler prestained Protein ladder; Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proben nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden die Proben zuerst mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer („5-fach Lämmli“) versetzt und 10 min bei 95 °C auf dem Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Polyacrylamid-Gele geladen. Diese Gele bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel, welche getrennt voneinander gegossen wurden.

Die Trenngele, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wiesen abhängig von dem durchgeführten Versuch, einen Acrylamidgehalt von 10 bzw. 12,5% auf. Die Sammelgele hatten stets einen Acrylamidgehalt von 6%. Die Elektrophorese erfolgte jeweils in SDS-Laufpuffer bei 25 mA.

Tabelle 4: Zusammensetzung von 12,5 %-igem Trenngel, 10 %-igem Trenngel, 6 %-igem Sammelgel, SDS-Laufpuffer und 5-fach Lämmli (SDS-Probenpuffer)

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

Trenngel 12,5 %-ig	10,45 ml H ₂ O bidest. 8,25 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 13,75 ml Acrylamid (30 %) 363 µl SDS (10 %) 330 µl APS (10 %) 22 µl TEMED
Trenngel 10 %-ig	13,2 ml H ₂ O bidest. 8,25 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 11,0 ml Acrylamid (30 %) 363 µl SDS (10 %) 330 µl APS (10 %) 22 µl TEMED
Sammelgel 6 %-ig	8.0 ml H ₂ O bidest. 3,1 ml 0,5 M Tris HCl (pH 6,8) 2,5 ml Acrylamid (30 %) 125 µl SDS (10 %) 125 µl APS (10 %) 12,5 µl TEMED
SDS-Laufpuffer	6,6 g Glycin 28,8 g Tris 0,1 % SDS ad 2 l H ₂ O bidest.

5-fach Lämmli (SDS-Probenpuffer)	0,625 M Tris-HCl (pH 6,8) 20% SDS 8,5 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 100 mM DTT
----------------------------------	--

2.2.2 Färbung von Proteinen mittels Coomassie Blue

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden nach der SDS-PAGE, wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Blue R250-Färbelösung bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert und anschließend 1 h lang mit Entfärbelösung, ebenfalls bei Raumtemperatur, wieder entfärbt, wobei der Puffer regelmäßig gewechselt wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Coomassie-Blue R250 Färbelösung und Entfärbelösung
(bidest. = doppelt destilliert)

Coomassie-Blue R250 Färbelösung	2,5 g Coomassie [®] R250 450 ml Methanol 450 ml H ₂ O bidest. 100 ml Eisessig
Entfärbelösung	450 ml Methanol 450 ml H ₂ O bidest. 100 ml Eisessig

2.2.3 Western Blot

Zum Nachweis der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine durch spezifische Antikörper wurden die Gele durch das Wet-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Membran wurde zuvor in Towbin-Puffer getränkt. Der Blot erfolgte bei 400 mA für 2,5 h. Um zu zeigen, dass der Proteintransfer vollzogen wurde, wurde die Membran im Anschluss mit Ponceau S angefärbt. Vor der Nachweisreaktion

mittels der spezifischen Antikörper wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5 %-iger Milchpulverlösung geblockt. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur auf der Wippe mit der Lösung inkubiert. Auch die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur auf der Wippe durchgeführt. Nach der Inkubation mit Milchpulver wurde die Membran 5 min in PBST gewaschen. Zum Beginn der Nachweisreaktion wurde die Membran mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern für 1 h inkubiert. Die Antikörper wurden zuvor in PBS-T verdünnt. Der Grad der Verdünnung war abhängig von dem jeweils verwendeten Antikörper. Im nächsten Schritt wurde die Membran dreimal 8 min in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für 1 h mit einem polyklonalen Zweitantikörper, welcher an die F_c-Region des Erstantikörpers bindet. An den Zweitantikörper ist wiederum ein Reporterenzym gebunden, das die Detektion mithilfe von Chemolumineszenz ermöglicht. Nach der Inkubation erfolgte erneutes Waschen der Membran für dreimal 8 min in PBST. Um die Proteine mittels Chemolumineszenz nachzuweisen, wurde die Membran anschließend für 90 s mit einer Detektionslösung (ECL) inkubiert. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird durch das Reporterenzym des Zweitantikörpers oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Dieses an der Stelle der Antikörperbindung emittierte Licht wurde durch Auflage eines Röntgenfilms detektiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Towbin-Puffer, Ponceau S-Lösung, Milchpulverlösung und Detektionslösung

(SDS = Natriumdodecylsulfat; Tris = Trishydroxymethylaminomethan; PBST = phosphate-bufferes saline Tween; bidest. = doppelt destilliert)

Towbin-Puffer	192 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS 25 mM Tris
Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau S 5 % Essigsäure
Milchpulverlösung	5 % Milchpulver Ad 50 ml PBST

Detektionslösung	Lösung A: 4,4 ml H ₂ O bidest. 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,0)
Lösung A und B wurden vor der Inkubation im Verhältnis 1:1 gemischt	50 µl 250 mM Luminol 22 µl 90 mM Coumarsäure Lösung B: 4,5 ml H ₂ O bidest. 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,0) 50 µl 30 % H ₂ O ₂

2.2.4 Strippen von Western Blots

Um gebundene Antikörper nach der durchgeführten Detektion eines Western Blots zu entfernen, wurden die verwendeten Membranen gestrippt. Dazu wurde die Membran zunächst für 5 min in einer sauren Lösung A auf einer Wippe inkubiert. Nach mehreren Wasch-Schritten wurde sie dann mit einer alkalischen Lösung B für 10 min auf der Wippe inkubiert. Nach erneutem mehrfachem Waschen wurde die Membran in 5 %-iger Milchpulverlösung geblockt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Strip Puffer

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan)

Lösung A (sauer)	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl HCl bis pH = 2,0
Lösung B (alkalisch)	0,5 M Tris NaOH bis pH = 11,0

2.2.5 Dot Blot

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde die Dot Blot Methode verwendet. Dabei wurde im ersten Schritt eines der beiden Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Hierzu wurde zunächst die Membran in die Dot

Blot Apparatur eingelegt. Anschließend wurde das Protein in absteigender Konzentration in die Vertiefungen der Apparatur pipettiert. Durch Anlegen eines Vakuums wurde das Protein auf der Membran immobilisiert. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S gefärbt. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5%-iger Milchpulverlösung gelegt, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blocken. Anschließend wurde die Membran mit dem zweiten Protein, von dem die Bindung an das immobilisierte Protein getestet werden soll, ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert und im Anschluss dreimal 8 min mit PBST gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen Proteins wurde die Membran daraufhin mit einem spezifischen Antikörper gegen dieses Protein sowie einem polyklonalen Zweitantikörper (jeweils 1 h bei RT) inkubiert und mittels Chemolumineszenz detektiert, wie bereits im Abschnitt „Western Blot“ erläutert.

2.2.6 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden die eukaryotische Makrophagenlinie J774A.1 verwendet. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dann in Erhaltungskulturen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Danach wurden die J774.A1 Zellen mit 37 °C warmem PBS einmal gewaschen und anschließend die Zellen in frischem, 37 °C warmem DMEM mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abgelöst und in der gewünschten Dichte neu ausgesät.

2.2.7 MTS-Assay

Der MTS-Assay (CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) ist ein kolorimetrischer Assay zur Beurteilung der Viabilität von Zellen. Dabei wird das MTS in Anwesenheit des im Reagenz ebenfalls enthaltenen Phenazin Ethosulfat (PES) und in Anwesenheit von zellulärem NADPH/NADH zu einem Formazan-Derivat reduziert. Dieses Formazan-Derivat hat ein Absorptionsmaximum bei 490 nm. Je größer die gemessene Absorption bei dieser Wellenlänge, desto mehr Formazan-Derivat wurde gebildet. Da die Menge an NADPH proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen ist, erlaubt die Messung der Absorption Rückschlüsse auf die Lebensfähigkeit der Zellen.

Zur Durchführung des Assay wurden Zellen in einer 96-Well Platte mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Well ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde bei den adhärennten Zellen das Medium gewechselt und die Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen und Substanzgemischen inkubiert, deren Auswirkung auf das Überleben der Zellen untersucht werden sollte. Zu unterschiedlichen Zeitwerten wurden dann jeweils 100 µl MTS Reagenz in die Wells gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Absorption bei 490 nm im Photometer gemessen.

2.2.8 Statistische Auswertung des MTS-Assays

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der durch den MTS-Assay ermittelten Werte wurden mit dem *student's t-test* und der Prism4 Software (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Die jeweils gemessene Absorption wurde in Bezug zu den Kontrollzellen, welche mit PBS inkubiert wurden, gesetzt. Es handelt sich jeweils um die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die Signifikanz ist wie folgt angegeben: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$.

2.2.9 Digitonin-Assay

Die Extraktion mit dem milden Detergenz Digitonin ist eine Methode zur Zellfraktionierung. Sie erlaubt die getrennte Untersuchung von Zytosol und Organellen bei kultivierten Zellen, da unter den gewählten Bedingungen nur die Zytoplasmamembran permeabilisiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode der Transport der Cargo-Proteine mithilfe des Transporter-Konstrukts in J774A.1 Makrophagen untersucht.

Zunächst wurde das Cargo-Protein mit dem Transporter-Konstrukt bei RT 30 min inkubiert, um die Komplexbildung zwischen Streptavidin und Biotin zu ermöglichen. Dann wurden die adhärennten, in 12-Well Platten dicht ausgesäten Zellen zunächst mit Transporter-Konstrukt und Cargo-Protein, sowie mit diversen Kontrollen 6 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit warmem 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit Digitonin (20 µg/ml, 120 µl/Well). Zur Inkubation wurde die 12-Well Platte abgedeckt für 5 min bei

Raumtemperatur und anschließend für 25 min, ebenfalls abgedeckt, auf Eis gestellt. Durch die Behandlung mit Digitonin kommt es zur Bildung von Poren in der Zellmembran, durch welche das Zytosol mit den darin enthaltenen Proteinen in den Überstand ausfließen kann, während die übrigen Zellorganellen im Pellet zurückbleiben (s. Abbildung 3). Nach der Inkubation mit Digitonin wurde der Überstand abgenommen, mit 5-fach SDS Probenpuffer (5-fach Lämmli) versetzt und für 10 min bei 95°C im Heizblock gekocht. Das Zellpellet wurde einmal mit 1x PBS gewaschen, anschließend in heißem 2,5-fach Lämmli vom Plattenboden abgekratzt und ebenfalls für 10 min bei 95°C gekocht. Mit den so gewonnen Proben wurde eine SDS-PAGE und anschließend ein Western Blot durchgeführt. Die Cargo-Proteine sowie das Transporter-Konstrukt wurden mittels spezifischer Antikörper bzw. Streptavidin-Peroxidase detektiert.

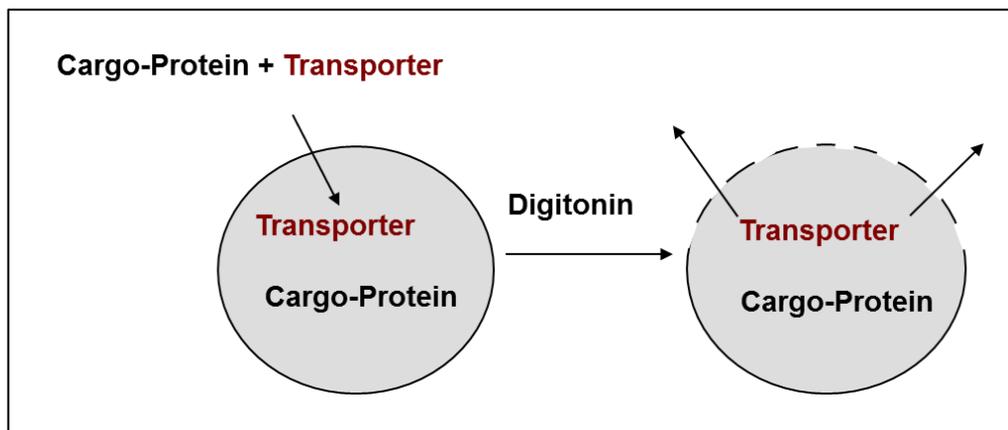


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Digitonin-Assay

2.2.10 Biotinylierung von PARP-1

Zur Biotinylierung an den Aminogruppen wurde PARP-1 mit Sulfo-NHS-Biotin in 2,5-fachem Überschuss für 30 min bei 25°C auf dem Heizblock inkubiert. Um das überschüssige Sulfo-NHS-Biotin zu entfernen, wurden die biotinylierten Proteine in Micro Bio-Spin® Chromatography Columns aufgereinigt. Anschließend wurde mit den auf diese Weise gewonnenen Proben eine SDS-PAGE durchgeführt, um die Biotinylierung nachzuweisen und eine Konzentrationsbestimmung durchzuführen. Dazu wurde die

biotinylierte PARP-1 in ansteigenden Volumina auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und es wurde ein Western-Blot durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran zunächst mit 5%-iger Milchpulverlösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und daraufhin ebenfalls für 1h bei RT mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert und schließlich nach Zugabe der Detektionslösung (ECL) detektiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurden die biotinylierten Proteine in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit einem BSA-Standard mit bekannter Konzentration auf ein Gel aufgetragen. Mithilfe von Adobe Photoshop 7.0 konnte durch Messung der Intensität der Banden mittels der densitometrischen Auswertung eine Kalibriergerade erstellt und die Konzentration der biotinylierten PARP-1 bestimmt werden.

2.2.11 Aufreinigung des Streptavidin-C3Mut Fusionsproteins

Das in dieser Arbeit verwendete Transporterprotein, bestehend aus der enzymatisch inaktiven C3bot-Mutante E174Q (C3Mut) und über einen Linker damit verbundenes Streptavidin 13 (Core-Streptavidin; Sano et al. 1995), wurde als GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Es wurde das zuvor in der AG Barth gentechnisch generierte Plasmid pGEX-2T-C3Mut-Stv verwendet (Christow et al. 2013). Der Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) dient hier der Bindung an Glutathion-gekoppelte Sepharose Beads im Sinne einer Affinitätschromatographie (s.u.).

Die Aufreinigung erfolgte mittels mit dem Plasmid transformierter *E.coli* Rosetta BL21. Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Es wurden 200 ml LB-Medium, welches mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (34 µg/ml) versetzt wurde, mit dem entsprechenden Glycerol-Stock angeimpft. Die Vorkultur wurde unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte das Ansetzen der Hauptkultur. Hierfür wurde 1 l LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin, + 34 µg/ml Chloramphenicol) mit 40 ml der Vorkultur versetzt und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Daraufhin wurde durch Zugabe von 200 µl 1M Isopropyl-1-Thio- α -D-Galaktopyranosid (IPTG) die Proteinexpression induziert und die Kultur über Nacht bei 16°C im Schüttler kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Ernte der Bakterien. Die Bakterienkultur wurde in Zentrifugenbecher überführt und in einem JA10-Rotor mit 5000 Upm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das

Pellet, welches bei der Zentrifugation entstand, wurde in 4 ml Lysepuffer mit Zusätzen resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension sechsmal für jeweils 15 s sonifiziert (power 25%). Es folgte erneut eine Zentrifugation in einem SS34-Rotor mit 12000 Upm für 15 min bei 4 °C. Die Sonifizierung und die anschließende Zentrifugation wurden insgesamt dreimal wiederholt. Als nächstes erfolgte die Inkubation des Überstands mit Glutathion Sepharose 4B Beads. Zur Vorbereitung wurden die Beads zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend jeweils mit 2200 Upm für 5 min abzentrifugiert. Der zuvor gewonnene Protein-Überstand wurde nun auf die Beads gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Während dieses Arbeitsschrittes erfolgte die Bindung des GST-gekoppelten Transporterproteins an die Glutathion Beads. Im Anschluss wurden die Beads mit 2200 Upm für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurden die Beads daraufhin jeweils zweimal mit 5 ml Waschpuffer und mit 5 ml PBS gewaschen (jeweils 2200 Upm, 3 min). Danach wurden die Beads in 1 ml PBS für 10 min im Überkopfschüttler eluiert und mit 2200 Upm für 3 min bei 4 °C erneut zentrifugiert. Um das Fusionsprotein von den Beads zu lösen wurde das Pellet mit einem Glutathion-haltigen Elutionspuffer für 10 min im Überkopfschüttler inkubiert. Durch zweimaliges Abzentrifugieren mit 9700 Upm für 30 s bei 4 °C wurden die Beads von dem das aufgereinigte Transportkonstrukt enthaltenden Überstand getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Der Nachweis einer erfolgreichen Proteinaufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (10 %) und Coomassie-Färbung erbracht. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines BSA-Standards ermittelt.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Lysepuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan; PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid; SDS = Natriumdodecylsulfat)

Lysepuffer	10 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH auf 7,4 eingestellt) 1 % Triton X-100 1 % PMSF Complete 1:50
Waschpuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH auf 7,4 eingestellt)

Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl (pH auf 8,0 eingestellt) 250 mM Glutathion 1 % SDS Complete 1:50
----------------	--

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Transport von Makromolekülen mithilfe des Streptavidin-C3Mut Transporters (Stv-C3Mut) untersucht werden. Dabei ermöglicht das Streptavidin die Bindung verschiedener biotinylierter Proteine als Fracht (Cargo) und C3Mut deren Transport in das Zytosol von Makrophagen.

3.1 Aufreinigung des Streptavidin-C3Mut Transporterproteins

Für die weiteren Versuche musste zunächst das Transport-Konstrukt Stv-C3Mut rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Hierfür wurde das bereits zuvor in der AG Barth gentechnisch hergestellte Plasmid pGEX-2T-C3Mut-Stv verwendet (Christow et al 2013). Die mit diesem Plasmid transformierten *E. coli* Rosetta BL21 wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,7 kultiviert. Dann wurde durch Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert und die Bakterien bei 16 °C über Nacht inkubiert. Es folgte die Lyse der Bakterien sowie mehrfache Sonifizierung des Lysats. Die erhaltenen Proben wurden mit Glutathion-Sepharose Beads inkubiert, um das GST-gekoppelte Fusionsprotein im Sinne einer Affinitätschromatographie zu binden. Das gebundene Stv-C3Mut wurde mit einem Glutathion-haltigen Puffer eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Proteine überprüft. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe eines BSA-Standards auf dem gleichen Gel bestimmt (Abbildung 4). Sie betrug 244,3 ng/μl. In den Spuren mit größeren Mengen aufgetragenem Protein zeigten sich unterhalb der Bande des intakten Stv-C3Mut-Proteins auch schwächere Banden mit kleinerem Molekulargewicht, welche vermutlich im Laufe des Aufreinigungsprozesses entstandenen Abbauprodukten des Stv-C3Mut entsprechen.

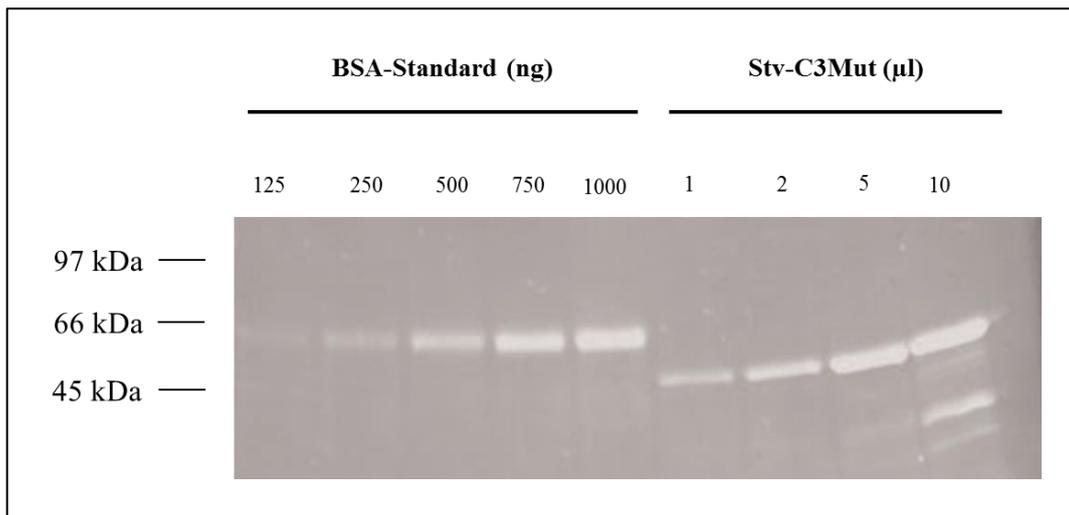


Abbildung 4: SDS-PAGE zum Nachweis von aufgereinigtem Stv-C3-Mut und Konzentrationsbestimmung durch einen BSA-Standard. Nach Expression des Stv-C3Mut in *E. coli* wurden die Bakterien lysiert und das Lysat mit Glutathion-Sepharose Beads inkubiert. Nach der Elution mit einem Glutathion-haltigen Puffer wurden die erhaltenen Proben zusammen mit BSA in ansteigender Menge auf ein Gel aufgetragen. Es folgte die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. (BSA = Bovine Serum Albumin; Stv = Streptavidin)

3.2 Biotinylierung von Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP)

Um die Bindung des Cargo-Proteins Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) an Streptavidin-C3Mut zu ermöglichen, wurde PARP (zur Verfügung gestellt von Prof. Alexander Bürkle, Institut für Molekulare Toxikologie, Universität Konstanz) biotinyliert. Biotin bindet mit hoher Affinität an das Streptavidin des Streptavidin-C3Mut Transporters, wodurch eine feste Bindung zwischen Cargo- und Transporterprotein ermöglicht wird. Des Weiteren macht die Biotinylierung eine Detektion von PARP in Western Blot Analysen mittels Streptavidin-Peroxidase möglich.

Für die Durchführung der Biotinylierung wurde PARP mit Sulfo-NHS-Biotin in zweieinhalbfachem Überschuss inkubiert. Das überschüssige Sulfo-NHS-Biotin wurde anschließend in Micro Bio-Spin® Chromatography Columns chromatographisch abgetrennt. Mit den erhaltenen Proben wurde eine SDS-Gelelektrophorese und ein Western Blot durchgeführt, welcher mit Streptavidin-Peroxidase detektiert wurde. (Abbildung 5).

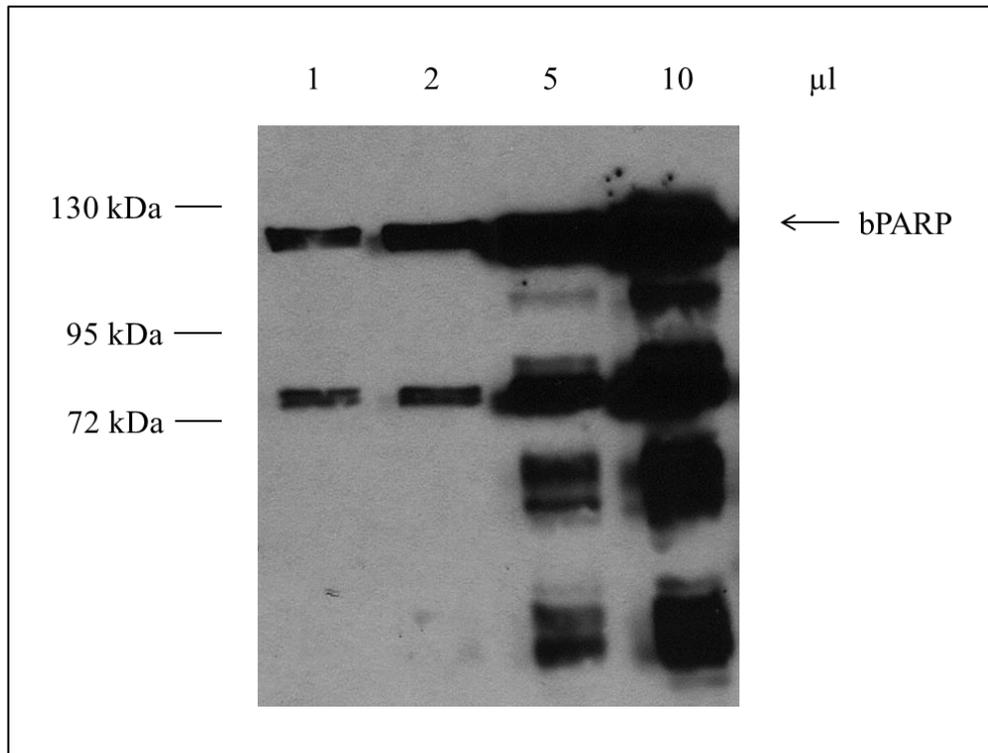


Abbildung 5: Western Blot Analyse der Biotinylierung von PARP. Biotinylierte Poly (ADP-Ribose) Polymerase (bPARP) wurde in ansteigender Menge auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach dem Western Blot wurde mit Streptavidin-Peroxidase detektiert. (ADP = Adenosindiphosphat)

Abbildung 5 zeigt die erfolgreiche Herstellung von biotinylierter Poly (ADP-Ribose) Polymerase, wodurch deren anschließende Bindung an Streptavidin-C3Mut ermöglicht wurde. Die verschiedenen Banden legen nahe, dass es zu einem Abbau des PARP Proteins gekommen ist. Es ist bekannt, dass PARP *in vivo* durch Caspase 3 und Caspase 7 in zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa gespalten wird (Chaitanya et al. 2010). Es wäre möglich, dass bei der Aufreinigung des Proteins auch diese Proteinfragmente gewonnen wurden.

3.3 Dot Blot Analyse der Interaktion von biotinylierter Poly (ADP-Ribose) Polymerase und Streptavidin-C3Mut

In diesem Versuch wurde die Bindung zwischen biotinylierter PARP und Streptavidin-C3Mut *in vitro* näher charakterisiert. Um den Transport von PARP in das Zytosol von J774A.1 Zellen zu ermöglichen, ist die Bindung von Transporter und dem zu transportierenden Protein eine wichtige Voraussetzung.

Hierzu wurde eine Dot Blot Analyse durchgeführt. Biotinylierte PARP (bPARP) und nicht biotinylierte PARP wurden in absteigenden Konzentrationen mittels der Dot Blot Apparatur durch ein angelegtes Vakuum auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. PBS wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Membran wurde mit Milchpulver geblockt. Um die erfolgreiche Immobilisierung von bPARP nachzuweisen, wurde, ohne vorherige Inkubation mit einem Zweit-Protein, direkt mit Streptavidin-Peroxidase detektiert. Die übrigen Spuren wurden mit dem Transporter Streptavidin-C3Mut beziehungsweise mit reinem C3Mut inkubiert („Overlay“). Nach mehreren Waschschrinen wurden die gebundenen Proteine mit einem anti-C3-Antikörper detektiert (Abbildung 6).

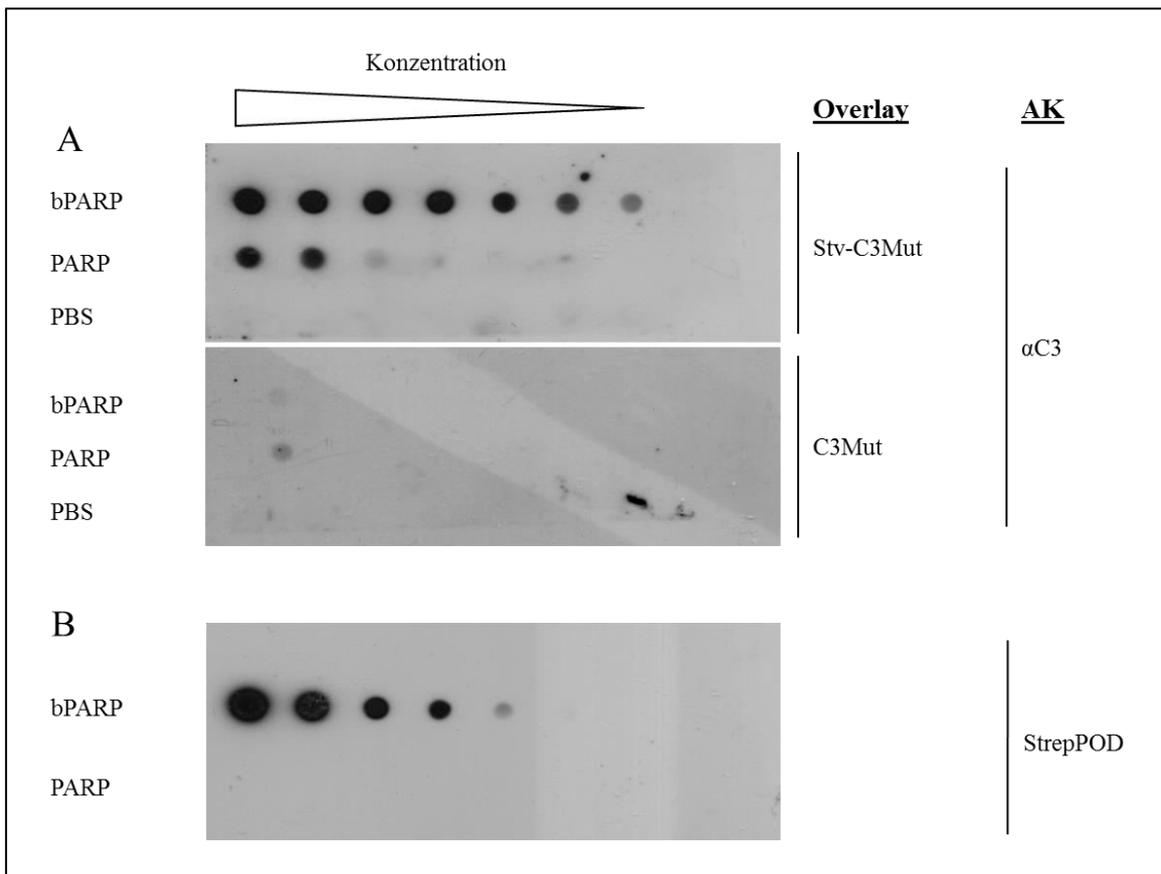


Abbildung 6: Dot Blot Analyse der Interaktion von biotinylierter Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 mit Streptavidin-C3Mut.

A: bPARP und PARP wurden in absteigender Konzentration (1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,3 ng, 15,6 ng) mit Hilfe der Dot Blot Apparatur auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Dann wurden je drei Spuren der Membran für 1 h mit Streptavidin-C3Mut und C3Mut inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurde mit einem Anti-C3 Antikörper detektiert.

B: Detektion von bPARP mittels Streptavidin-Peroxidase

(bPARP = biotinylierte Poly (ADP-Ribose) Polymerase ; PARP = Poly (ADP-Ribose) Polymerase ; Stv-C3Mut = Streptavidin-C3Mut; PBS = Phosphate Buffered Saline; AK = Antikörper; αC3 = AntiC3-Antikörper; StrepPOD = Streptavidin Peroxidase)

Das Ergebnis in Abbildung 6 zeigt, dass der Transporter Streptavidin-C3Mut bis zur geringsten verwendeten Konzentration an biotinylierte PARP bindet. Diese stabile Bindung kommt hier zwischen dem Streptavidin des Stv-C3Mut Fusionsproteins und dem Biotin von bPARP zustande. Überraschenderweise zeigt die Abbildung auch eine Interaktion des Transporters mit der Wildtyp PARP. Diese ist aber deutlich schwächer ausgeprägt als die zuvor beschriebene Bindung mit biotinylierter PARP und könnte auf einer unspezifischen Bindung beruhen. C3Mut alleine zeigt weder eine Interaktion mit biotinylierter PARP noch mit der Wildtyp PARP.

Zusammenfassend konnte hier *in vitro* eine stabile Bindung des Transporters an das zu transportierende Protein nachgewiesen werden, wodurch diese wichtige Voraussetzung für einen anschließenden zellulären Transportversuch erfüllt war.

3.4 Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von J774A.1 Zellen

Bereits zuvor konnte in der AG Barth der Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von J774A.1 Zellen mithilfe des Stv-C3Mut Transporters nachgewiesen werden (Lillich et al. 2012; Christow et al. 2013). Dafür wurde unter anderem biotinylierte RNase A erfolgreich als zu transportierendes Protein verwendet. Im Folgenden werden nun Versuche vorgestellt, die den Transport anderer, bisher nicht verwendeter Cargo-Proteine untersuchen sollten.

3.4.1 Internalisierung von biotinylierter PARP

Um die Internalisierung biotinylierter PARP (bPARP) in J774A.1-Zellen näher zu untersuchen, wurde eine Digitonin-basierte Zellfraktionierung (Digitonin Assay) verwendet.

Hierzu wurden J774A.1-Zellen dicht in 12-well Platten ausgesät. Die Zellen wurden dann mit Stv-C3Mut, bPARP oder beiden Proteinen inkubiert. Um die Bindung des Transporters und bPARP zu ermöglichen, wurden diese für 30 min zusammen vorinkubiert. Vor der Behandlung mit Digitonin wurden die Zellen dann für 5 h bzw. 24 h inkubiert. Durch die Zugabe von Digitonin kommt es zur Bildung von Poren in der Zellmembran, durch welche das Zytosol aus den Zellen fließt, während die Zellorganellen im Pellet

verbleiben. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 7).

Durch Detektion von HSP90 wurde gezeigt, dass vergleichbare Mengen Protein in den einzelnen Spuren verwendet wurden (Abbildung 7 B).

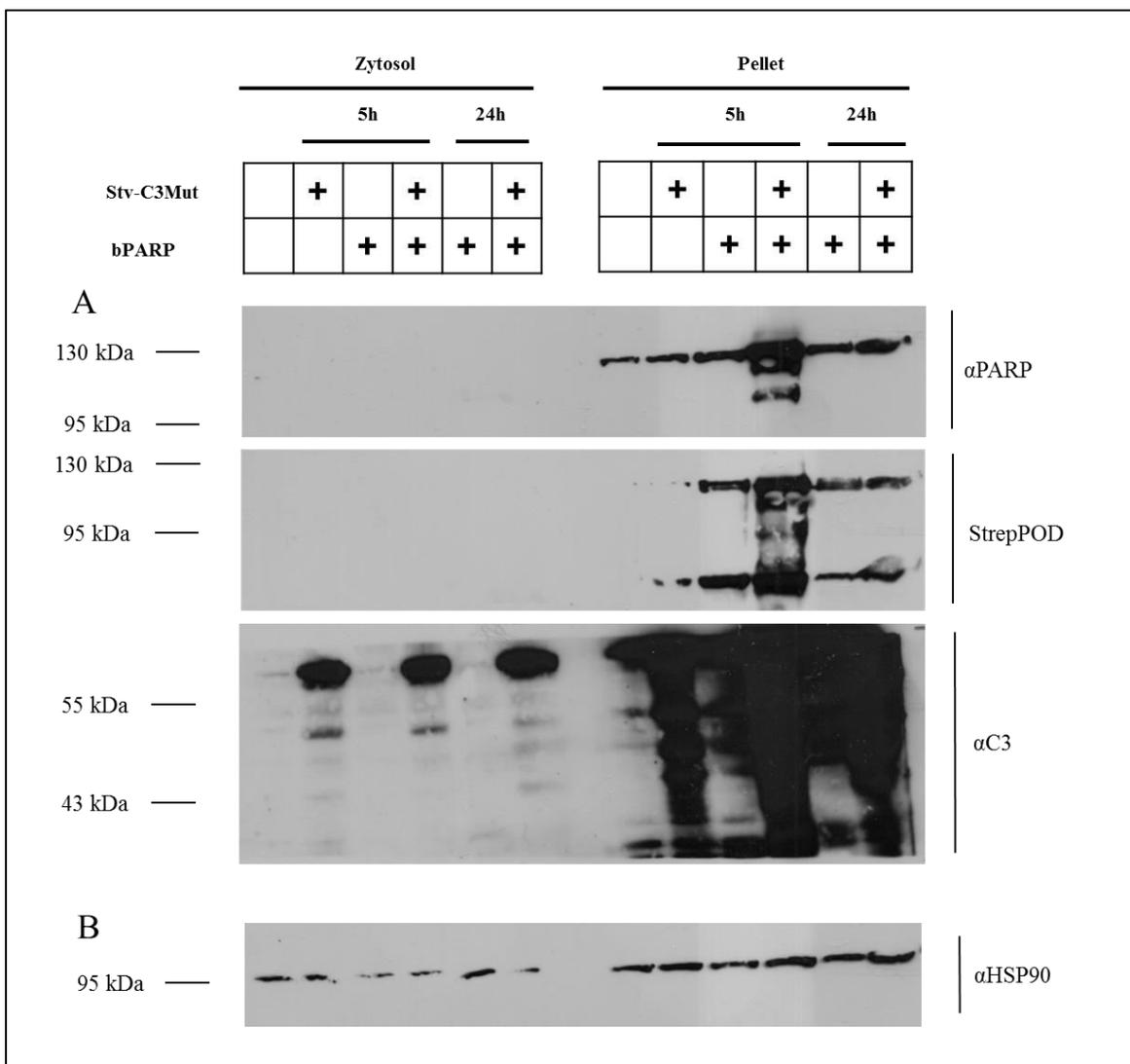


Abbildung 7: Digitonin-basierte Zellfraktionierung zur Untersuchung der Internalisierung von bPARP in das Zytosol von J774A.1 Zellen

Stv-C3Mut (4µg/ml) und bPARP (7µg/ml) wurden für 30 min zusammen vorinkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Außerdem wurden die Zellen mit PBS als Negativkontrolle sowie mit Stv-C3Mut und bPARP alleine inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde Digitonin zur Zellfraktionierung zugegeben. Die erhaltenen Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und es erfolgte ein Western Blot.

A: Es wurde mit einem Anti-C3- und einem Anti-PARP-Antikörper detektiert. Zum Entfernen der gebundenen Antikörper wurde dann der obere Teil der Membran gestrippt und mit Streptavidin-Peroxidase erneut detektiert.

B: Detektion von HSP90 zur Verifizierung vergleichbarer Proteinmengen.

(Stv-C3Mut = Streptavidin-C3Mut; bPARP = biotinylierte Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1; αPARP = Anti-PARP Antikörper; StrepPOD = Streptavidin-Peroxidase; αC3 = Anti-C3 Antikörper; αHSP90 = Antikörper gegen Hitzeschockprotein 90)

Die Abbildung 7 A (unterer Abschnitt) zeigt ein relativ starkes Signal bei der Detektion mit dem α C3-Antikörper im Pellet, also der Fraktion, die den zurückgebliebenen Zellorganellen entspricht. Dies entspricht vermutlich der Aufnahme und dem Verbleib von bPARP in endosomalen Vesikeln. Hier sind auch mehrere Abbau-Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht zu sehen. Dies wurde bereits zuvor beobachtet und ist vermutlich Folge des Protein-Abbaus durch das saure Milieu in den Endosomen (Christow et al. 2013). Von größerem Interesse ist allerdings, dass Stv-C3Mut auch deutlich in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden konnte, was bisherige Ergebnisse der AG Barth bestätigt (Lillich et al. 2012, Christow et al. 2013). Hier fällt jedoch auf, dass sich die Banden für die verschiedenen Zeitwerte (5 h und 24 h) in ihrer Stärke nicht wesentlich unterscheiden.

Biotinylierte PARP (bPARP) wurde zunächst mit einem α PARP-Antikörper detektiert (Abbildung 7 A oberer Ausschnitt). Anschließend wurde die Membran gestrippt, um die gebundenen Antikörper zu entfernen und dann erneut mit Streptavidin-Peroxidase detektiert (Abbildung 7 A mittlerer Ausschnitt). Es fällt auf, dass weder durch Detektion mit α PARP noch durch Detektion mit Streptavidin-Peroxidase bPARP im Zytosol der Zellen nachweisbar ist. Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen der AG Barth, in denen ein Transport von biotinylierter RNase A und biotinyliertem Diphtherie-Toxin A-Fragment in das Zytosol der J774A.1 Zellen mittels des auch hier verwendeten Transport-Konstruktes nachgewiesen werden konnte (Lillich et al. 2012; Christow et al. 2013). In der Fraktion der extrahierten Zellen ist bei der Detektion mit α PARP deutlich mehr PARP in den Zellen nachweisbar, die für 5 h mit Stv-C3Mut und bPARP zusammen inkubiert wurden. Dies bestätigt sich auch bei der Detektion mit Streptavidin-Peroxidase. Nach 24 h zeigt sich jeweils ein deutlich schwächeres Signal, wofür ein intrazellulärer Abbau von bPARP ursächlich sein könnte. Die Detektion von PARP mit zwei verschiedenen Antikörpern war in diesem Fall wichtig, um zwischen endogen exprimierter PARP und der von außen zugeführten bPARP zu unterscheiden. Da PARP als nukleäres Enzym in allen eukaryotischen Zellen vorkommt, wird diese im Pellet in allen Spuren durch den α PARP Antikörper detektiert. Nach 5 h ist das Signal jedoch durch die zusätzlich aufgenommene bPARP deutlich stärker. Die durch Streptavidin-Peroxidase detektierten schwächeren Signale der mit bPARP alleine behandelten Zellen sind vermutlich auf eine unspezifische Bindung an der Zelloberfläche zurückzuführen. Zusammen betrachtet könnten die in diesem Versuch erlangten Erkenntnisse darauf hindeuten, dass bPARP durch Stv-C3Mut in frühe Endosomen der J774A.1 Zellen

aufgenommen wird. Von dort wird das Enzym jedoch nicht weiter in das Zytosol transportiert. Der Transporter war hingegen im Zytosol deutlich nachweisbar.

3.4.2 Internalisierung von biotinyliertem DTA

Um den Transport von Proteinen durch das Stv-C3Mut Transport-Konstrukt zu untersuchen, wurde in diesem Versuch biotinyliertes DTA (bDTA) (zur Verfügung gestellt von M. Schuster, AG Barth) als Cargo-Protein verwendet. DTA ist das enzymatisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins. Dieses A-Fragment katalysiert die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor-2 (EF-2) und hemmt so die Translation in betroffenen Zellen (Collier 1967; Honjo et al. 1968), was schließlich zur Apoptose der Zellen führt (Kochi und Collier 1993). Als AB-Toxin besitzt DTA ohne das B-Fragment des Diphtherie-Toxins nicht die Möglichkeit in das Zytosol von Zellen zu gelangen und dort seine enzymatische Aktivität auszuüben (Collier 2001). In dem hier beschriebenen Versuch wurde untersucht, ob biotinyliertes DTA durch Stv-C3Mut in das Zytosol von J774A.1 Zellen transportiert werden kann.

Hierzu wurde die Lebendzellzahl (Zellviabilität) mithilfe des MTS-Assay (CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega; genaue Beschreibung der Methode siehe 2.2.) bestimmt. Stv-C3Mut und bDTA wurden zunächst 30 min zusammen *in vitro* vorinkubiert und anschließend zu den in einer 96-Well Platte ausgesäten J774A.1 Zellen gegeben. Als Kontrollen wurden bDTA alleine, das enzymatisch inaktive bDTA-E148S (Wilson et al. 1990), Stv-C3Mut alleine, Stv-C3Mut und bDTA-E148S zusammen (30 min vorinkubiert) und Streptavidin (Stv) zusammen mit bDTA (30 min vorinkubiert) im gleichen Experiment verwendet. Staurosporin, ein bekannter Induktor der Apoptose, wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Als Referenz bildende Negativkontrolle wurden die Zellen mit PBS inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen fotografiert (Abbildung 8). Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die Zellen, die mit Stv-C3Mut und bDTA inkubiert wurden, charakteristische morphologische Veränderungen. Ein ähnlicher Effekt wird beispielsweise auch bei der Vergiftung von HeLa Zellen mit wildtypischem DT beobachtet und ist auf die Toxin-vermittelte Zellschädigung zurückzuführen (Strauss und Hendee 1959). Außerdem fiel eine deutliche Reduzierung der Zelldichte auf. Um diese Beobachtung zu quantifizieren wurde das MTS-Reagenz in das Kulturmedium gegeben und die Zellen für 1 h damit inkubiert.

Anschließend wurde die Absorption, welche hier direkt mit der Anzahl lebender Zellen korreliert, bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen und statistisch ausgewertet (Abbildung 9).

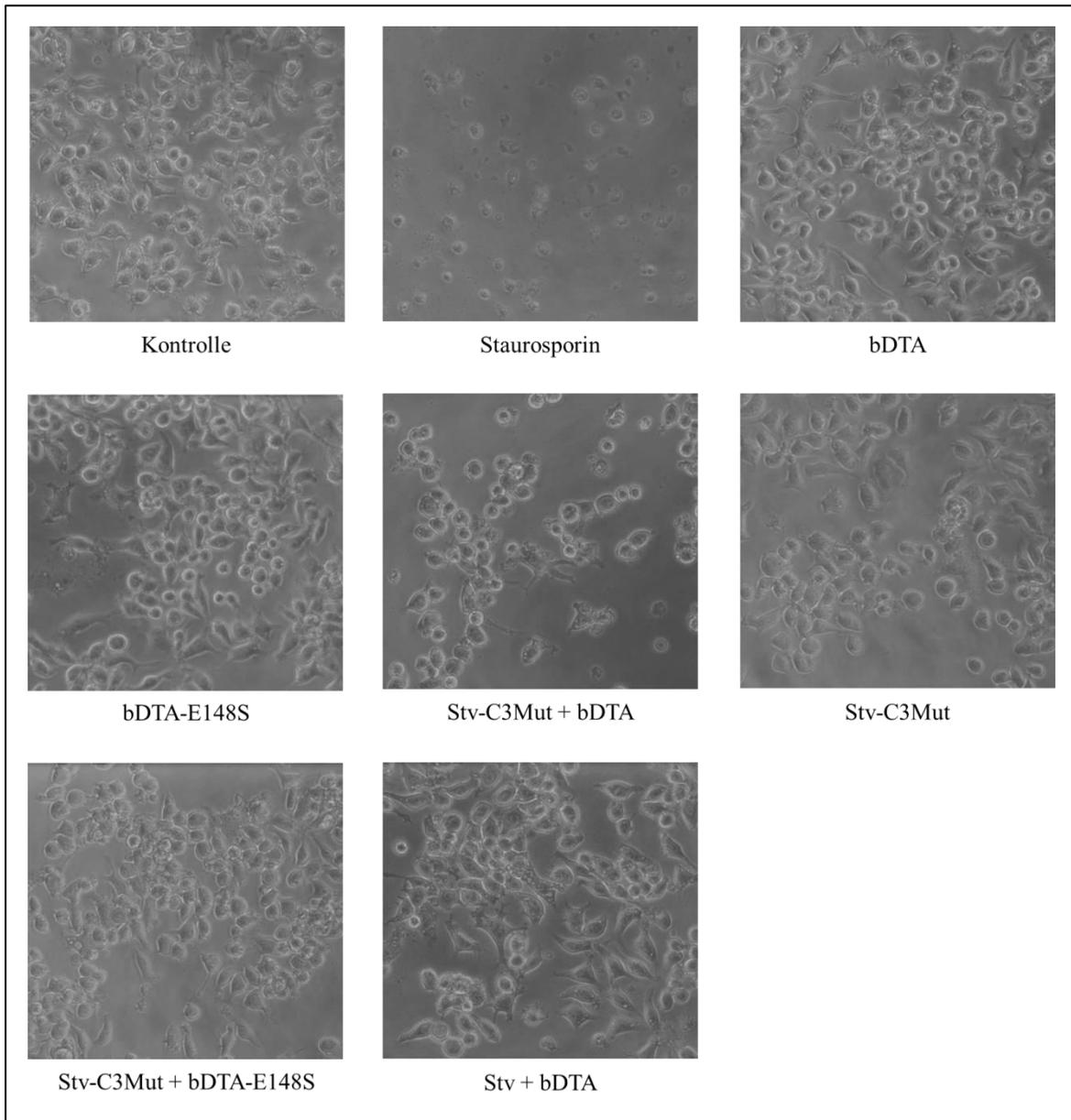


Abbildung 8: Untersuchung der Internalisierung von bDTA durch den Stv-C3Mut Transporter.

J774A.1 Zellen wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und mit bDTA (1 $\mu\text{g/ml}$), Stv-C3Mut (6 $\mu\text{g/ml}$), Streptavidin (Stv) (1,5 $\mu\text{g/ml}$) und bDTA-E148S (1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Vor der Inkubation mit einem Gemisch aus zwei Proben wurden diese jeweils für 30 min zusammen vorinkubiert. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (1 μM) verwendet. Nach 48 h wurden die Zellen mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Zeiss, Jena) fotografiert.

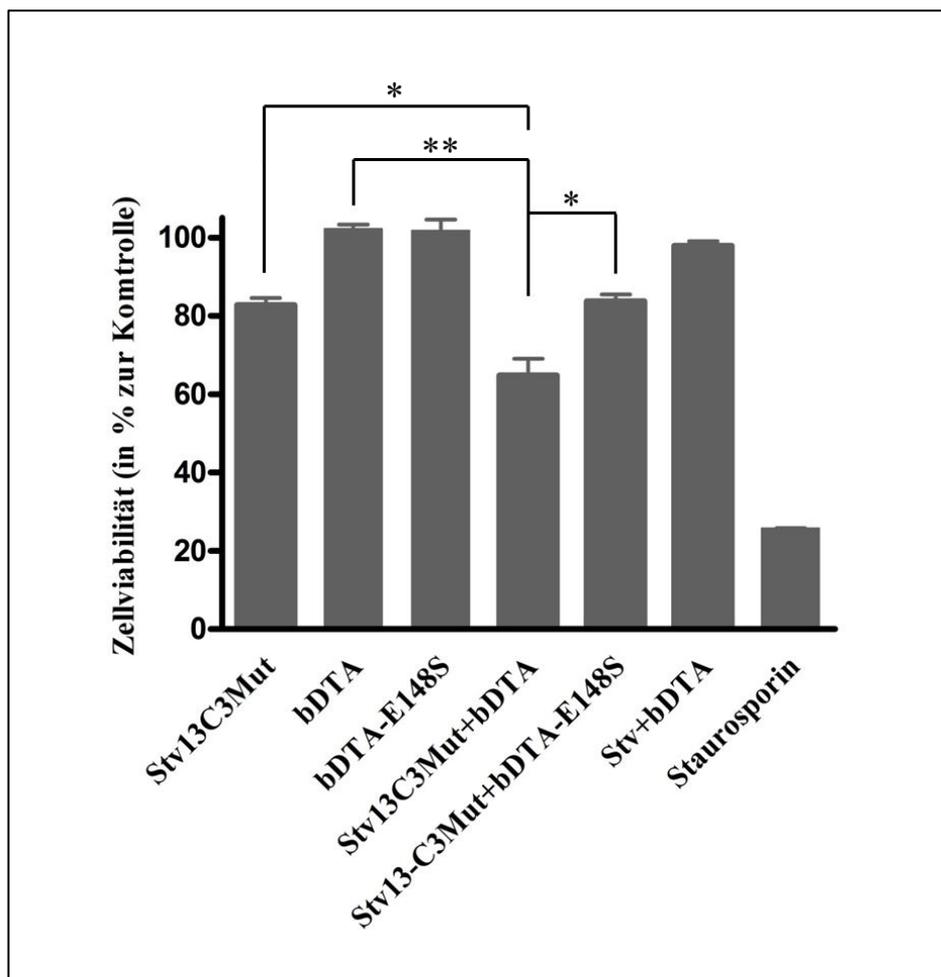


Abbildung 9: MTS-Test zur Untersuchung der Internalisierung von bDTA durch Stv-C3Mut.

J774A.1 Zellen wurden in einer 96-Well Platte ausgesät und mit bDTA (1 μ g/ml), Stv-C3Mut (6 μ g/ml), Streptavidin (Stv) (1,5 μ g/ml) und bDTA-E148S (1 μ g/ml) behandelt. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (1 μ M) verwendet. Nach 48 h wurde MTS Reagenz hinzugegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch gemessen. Alle erhaltenen Werte wurden in Bezug zu den Kontrollzellen, welche mit PBS inkubiert wurden, gesetzt. Es handelt sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 3; jede Probe wurde in je 3 Wells eingebracht). Die Signifikanz wurde mit dem student's t-test und der GraphPad Prism® Software bestimmt (* = p < 0,05, ** = p < 0,005). (bDTA = biotinyliertes DTA; bDTA-E148S = biotinyliertes DTA-E148S; MTS = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium); PBS = Phosphate Buffered Saline; Stv-C3Mut = Streptavidin-C3Mut; Stv = Streptavidin)

Zusammengefasst zeigt sich nach 48 h Inkubation eine deutliche Einschränkung der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen bei denjenigen Zellen, welche mit dem Stv-C3Mut Transporter und bDTA zusammen inkubiert wurden. Sowohl die Behandlung mit bDTA als auch mit bDTAE148S alleine hatten keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt vermutlich der Streptavidin-Anteil des Stv-C3Mut zu einer veränderten Zellspezifität. Offenbar bindet dieses Streptavidin vermehrt an Membranproteine, was zur Aufnahme des Transporterproteins auch in Nicht-Makrophagen führt. In dem hier vorgestellten Versuch hatte die Kombination aus Streptavidin und bDTA keinen Einfluss auf Zellmorphologie und –viabilität. Dies zeigt, dass Streptavidin alleine nicht die Fähigkeit besitzt, das biotinylierte Cargo-Protein in die J774A.1 Makrophagen zu transportieren. Die Viabilität der mit Staurosporin behandelten Zellen war erwartungsgemäß deutlich reduziert. Überraschenderweise zeigte sich auch bei den Zellen, die mit dem Transport-Konstrukt alleine bzw. zusammen mit dem enzymatisch inaktiven bDTA-E148S behandelt wurden, eine verminderte Anzahl lebender Zellen. Die übrigen verwendeten Proben hatten dagegen keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Das lässt den Schluss zu, dass die in diesem Versuch verwendete Probe von Stv-C3Mut in geringem Ausmaß zytotoxisch wirkt. Diese Wirkung ist jedoch nach längerer Inkubation von 72 h komplett reversibel. Nach dieser Zeit liegt die Viabilität der Zellen, die mit Stv-C3Mut alleine inkubiert wurden im Bereich der Kontrollzellen, während die der mit Transporter und bDTA zusammen inkubierten Zellen weiterhin deutlich reduziert ist (Christow et al. 2013).

Zusammenfassend zeigen die Zellen, die mit Stv-C3Mut und bDTA zusammen inkubiert wurden, eine signifikant niedrigere Zellviabilität, was auf einen erfolgreichen Transport von bDTA über den Transporter in das Zytosol der J774A.1 Makrophagen zurückzuführen ist.

4. Diskussion

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene bakterielle AB-Toxine als rekombinante Proteine für die Herstellung von Transportsystemen zum Einbringen pharmakologisch wirksamer Proteine in das Zytosol eukaryotischer Zellen verwendet. Dabei wurde die Toxizität der jeweiligen Toxine entweder durch Punktmutationen innerhalb der enzymatischen Domäne oder durch deren Deletion ausgeschaltet (Barth und Stiles 2008). Ein Beispiel für ein solches Transportsystem ist C2IIa/C2IN-Streptavidin, welches auf dem binären C2-Toxin von *Clostridium botulinum* basiert und die Aufnahme biotinylierter Moleküle in verschiedene eukaryotische Zelltypen vermittelt (Fahrer et al. 2010b; Fahrer et al. 2010c). Es besteht aus der N-terminalen Domäne der enzymatischen Komponente C2I (C2IN) und dem daran fusionierten Streptavidin. Für einen erfolgreichen Transport biotinylierter Moleküle ist die Zugabe der separaten Transportkomponente C2IIa nötig, welche das C2IN-Streptavidin-Protein in das Zellinnere einschleust (Fahrer et al. 2010b; Fahrer et al. 2010c).

Das C3-Toxin von *Clostridium botulinum* (C3bot) ist als Bestandteil eines solchen Transportsystem besonders interessant, da es spezifisch in Makrophagen und Monozyten aufgenommen wird (Fahrer et al. 2010a). Makrophagen und Monozyten spielen bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle in Krankheitsentstehung und -verlauf. Verschiedene Subtypen der akuten myeloischen Leukämie (AML) entstehen durch genetische Aberrationen in Vorläuferzellen dieser Zellreihe und sind durch die vermehrte Produktion dieser unreifen Vorläuferzellen gekennzeichnet. Im Rahmen der Atherosklerose sind Makrophagen an der Entstehung der atheromatösen Plaques beteiligt, indem sie subendotheliales LDL phagozytieren und so zu sogenannten Schaumzellen werden, wobei verschiedene proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden (Libby et al. 2011).

Ein C3bot1-basiertes Transportsystem eröffnet grundsätzlich Möglichkeiten, um enzymatisch aktive Proteine oder andere pharmakologische Wirkstoffe spezifisch in Makrophagen und Monozyten zu transportieren und somit eventuell in Zukunft neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zuvor in der AG Barth entwickeltes, gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein aus enzymatisch inaktivem C3bot1E174Q (C3Mut) und Streptavidin verwendet, wobei C3Mut die zelluläre Aufnahme und Streptavidin die

Bindung biotinylierter Proteine vermitteln soll (Christow et al. 2013). In der Publikation von Christow et al. fungiere ich als Coautor. Im Jahr 2010 konnten Fahrer et al. zeigen, dass die beiden C3-Exoenzyme C3bot1 und C3lim spezifisch in Makrophagen und Monozyten aufgenommen werden (Fahrer et al. 2010a). Zuvor hatte man angenommen, dass C3-Exoenzyme nur über unspezifische, ineffiziente Mechanismen wie Pinozytose in Zellen aufgenommen werden (Aktories et al. 2004). Es konnte allerdings bisher noch kein Rezeptor identifiziert werden, der die Aufnahme von C3-Toxinen in Makrophagen vermittelt. Jedoch konnten Rohrbeck et al. kürzlich zeigen, dass es sich bei dem Bindungspartner von C3 auf der Zelloberfläche von J774A.1 Makrophagen um ein Protein handelt und dessen posttranslationale Modifizierung durch Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Proteininteraktion spielt (Rohrbeck et al. 2014b). Neuesten Erkenntnissen zufolge handelt es sich hierbei um das Intermediärfilament Vimentin (Rohrbeck et al. 2014a). Vimentin befindet sich an der Zelloberfläche von J774A.1 Makrophagen und vermittelt nach der Bindung von C3 dessen endozytotische Aufnahme (Rohrbeck et al. 2014a).

Im Gegensatz zu wildtypischem C3bot1 wird Stv-C3Mut wider Erwarten auch in HeLa Epithelzellen und CHO-K1 Fibroblasten aufgenommen (Christow et al. 2013). Dieses Verhalten zeigte sich bereits zuvor bei einem chemisch hergestellten Konjugat aus C3Mut und Streptavidin (Lillich et al. 2012). Eine mögliche Erklärung für diese Änderung der Zellspezifität ist, dass das an C3Mut konjugierte Streptavidin die Bindung an Membranproteine vermittelt und so zur vermehrten Aufnahme des Konjugats führt (Lillich et al. 2012). Eine Absättigung der Biotin-Bindungsstellen am Streptavidin mit biotinylierten Proteinen scheint diesen Effekt allerdings wieder rückgängig zu machen (Christow et al., 2013), worauf an späterer Stelle der Diskussion noch genauer eingegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport zweier unterschiedlicher Cargo-Proteine mithilfe des gentechnisch hergestellten Streptavidin-C3Mut Transporters untersucht. Zunächst erfolgte die Aufreinigung des Fusionsproteins aus *E. coli* Bakterien, die das Expressionsplasmid pGEX-2T-C3Mut-Stv enthielten. Die Aufreinigung des Fusionsproteins folgte dem zuvor beschriebenen Vorgehen (Christow et al. 2013). Mithilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung konnte die erfolgreiche Aufreinigung bestätigt und die Konzentration des Proteins bestimmt werden.

Im nächsten Schritt wurden die zu transportierenden Proteine (Cargo-Proteine) mit Biotin versehen, um die Bindung an das Streptavidin des Stv-C3Mut zu ermöglichen. Streptavidin besitzt eine starke Affinität für Biotin und ist auch bei extremen pH Werten stabil (Laitinen et al. 2006). Streptavidin wurde aufgrund dieser günstigen Eigenschaften bereits als Teil anderer Transportsysteme verwendet, darunter das bereits erwähnte C2IIa/C2IN-Streptavidin (Fahrer et al. 2010b; Fahrer et al. 2010c). Als Cargo-Proteine wurden das nukleäre Enzym Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und das katalytisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins (DTA) verwendet. Mithilfe der Dot Blot Methode konnte eine stabile Bindung zwischen Stv-C3Mut und biotinylierter PARP (bPARP) nachgewiesen werden, womit eine wichtige Voraussetzung für den Transport erfüllt war. Bereits zuvor gelang es Lillich et al. verschiedene mit Biotin versehene Cargo-Proteine mittels des chemisch hergestellten Stv-C3Mut erfolgreich in J774A.1-Makrophagen zu transportieren. In Versuchen zur Zellfraktionierung mit Digitonin, welche auch in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden, konnten sowohl biotinylierte Ribonuclease A (RNase A) als auch biotinyliertes C-Typ Lysozym im Zytosol von J774A.1 Makrophagen nachgewiesen werden, wenn sie jeweils zusammen mit dem Transportkonstrukt appliziert wurden (Lillich et al. 2012). Allerdings erreichte nur ein kleiner Teil dieser Cargo-Proteine das Zytosol, während ein Großteil in der Fraktion der extrahierten Zellorganellen zu finden war (Lillich et al. 2012). In ersten Versuchen mit dem gentechnisch hergestellten Stv-C3Mut Fusionsprotein konnte ein erfolgreicher Transport des biotinylierten Farbstoffes Fluorescein mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Christow et al. 2013).

Das Ergebnis der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchung des Transportes von bPARP mithilfe dieses gentechnisch hergestellten Stv-C3Mut weicht von den bisherigen Ergebnissen teilweise ab. In der hier durchgeführten Zellfraktionierung konnte keinerlei PARP im Zytosol der J774A.1 Zellen nachgewiesen werden, nachdem diese mit Stv-C3Mut und bPARP inkubiert wurden. In den extrahierten Zellorganellen war PARP dagegen deutlich vorhanden. Am ehesten handelt es sich hierbei um in Endosomen lokalisierte PARP. Fahrer et al. konnten zeigen, dass Bafilomycin A1, ein Inhibitor der v-ATPase und damit der Ansäuerung von Endosomen, die ADP-Ribosylierung von Rho in J774A.1 Zellen durch C3bot1 hemmt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass C3bot1 wie auch andere bakterielle ADP-Ribosyltransferasen aus azidifizierten frühen Endosomen in das Zytosol translozieren (Fahrer et al. 2010a). Während andere Toxine wie das Anthrax-Toxin

oder das C2-Toxin jedoch stabile Poren in der endosomalen Membran bilden, durch die deren jeweilige Enzymkomponente in das Zytosol wandern kann, bildet C3bot1 nur transiente und unregelmäßige Poren aus (Fahrer et al. 2010a). Offenbar bleibt die auf diesem Wege transportierte PARP in den Endosomen hängen und kann nicht in das Zytosol übertreten. Ein auffallender Unterschied von PARP im Vergleich zu den bereits erfolgreich transportierten Cargo-Proteinen (s.o.) ist das deutlich größere Molekulargewicht. So beträgt dieses bei PARP1 ca. 116 kDa, während RNase A mit ca. 14 kDa (Raines 1998) und C-Typ Lysozym mit ca. 15 kDa (Phillips 1967) um ein Vielfaches kleiner sind. Es ist denkbar, dass PARP aufgrund seiner Größe nicht durch die Poren in der endosomalen Membran hindurch in das Zytosol gelangen kann.

Als zweites Cargo-Protein wurde DTA, das enzymatisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa (Collier 1975), verwendet. Dieses katalysiert im Zytosol die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 (EF-2), wodurch dieser inaktiviert und damit die Proteinsynthese gehemmt wird, was schließlich zur Apoptose der betroffenen Zelle führt (Collier 1967; Honjo et al. 1968; Kochi und Collier 1993). Ohne das zugehörige B-Fragment besitzt DTA alleine nicht die Fähigkeit in das Zytosol von Zielzellen zu gelangen. In dieser Arbeit konnte mittels eines Zellviabilitätstests (MTS) gezeigt werden, dass biotinyliertes DTA (bDTA) durch das Stv-C3Mut in J774A.1 in das Zytosol von J774A.1 Makrophagen transportiert wird. Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität bei den Zellen, die mit dem Transporter plus bDTA inkubiert wurden, im Vergleich zu den verwendeten Kontrollen. In direktem Anschluss an die vorliegende Arbeit, konnte die AG Barth zeigen, dass die Inkubation mit Stv-C3Mut zusammen mit bDTA keinen Einfluss auf die Zellviabilität von HeLa Epithelzellen hat und damit nicht in diese Zellen aufgenommen wird, während wildtypisches Diphtherie-Toxin eine Reduzierung der Viabilität der HeLa-Zellen um 40 % bewirkte (Christow et al. 2013). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die zuvor beschriebene Veränderung der Zelltypselektivität des Transporters durch die Bindung biotinylierter Cargo-Proteine rückgängig gemacht wird. Ein zunächst beobachteter zytotoxischer Effekt des Transporters alleine war nach einer längeren Inkubationszeit wieder rückläufig und somit reversibel (Christow et al. 2013).

Zusammen betrachtet zeigt die vorliegende Arbeit, dass sich das gentechnisch hergestellte Stv-C3Mut Fusionsprotein für den Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von

Makrophagen eignet, wobei dies jedoch nicht uneingeschränkt für alle Cargo-Proteine gilt. Vor allem kleinere Proteine scheinen sich gut für diesen Transport zu eignen.

Um die Etablierung des Stv-C3Mut als zuverlässiges Transportsystem weiter voran zu treiben, ist es in Zukunft sicherlich wichtig, zunächst den Aufnahmemechanismus von C3-Exoenzymen weiter zu untersuchen. Vor allem der exakte Weg der Proteine in das Zytosol nach der endozytotischen Aufnahme ist auch für das genaue Verständnis der Funktion des Transporters unerlässlich. Des Weiteren sollten Versuche unternommen werden, weitere Cargo Proteine auch in andere makrophagenartige Zelltypen oder deren Vorläuferzellen, wie beispielsweise Humane Promyeloische Leukämiezellen, zu transportieren.

5. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit wurde der Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von J774A.1 Makrophagen mithilfe des Streptavidin-C3Mut Transportsystems (Stv-C3Mut) untersucht. Es handelt sich dabei um ein Fusionsprotein aus C3Mut, einer enzymatisch inaktiven Mutante des C3bot1 (C3 Exoenzym von *Clostridium botulinum*) und Streptavidin, wobei C3Mut die zelluläre Aufnahme und Streptavidin die Bindung an das Biotin der „Fracht“-Proteine (Cargo-Proteine) vermitteln sollte.

C3bot1 gehört zu der Gruppe der C3-Exoenzyme und katalysiert im Zytosol die Mono-ADP-Ribosylierung von Rho A, B und C, was zur Inaktivierung dieser kleinen GTPasen führt. C3bot1 und ebenso C3Mut werden spezifisch in Makrophagen durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und translozieren dann bei niedrigem pH-Wert aus frühen Endosomen in das Zytosol der jeweiligen Zielzellen. Streptavidin ist ein von *Streptomyces avidinii* produziertes Protein mit sehr hoher Affinität für Biotin. Es ist außerordentlich stabil bei niedrigen pH-Werten. Als Cargo-Proteine wurden Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) und das enzymatisch aktive A-Fragment des Diphtherie-Toxins (DTA) verwendet. PARP1 ist ein ubiquitär vorkommendes, nukleäres Enzym und an verschiedenen Prozessen wie beispielsweise der DNA-Reparatur oder der Regulierung der Chromatin-Struktur beteiligt. DTA katalysiert im Zytosol die Mono-ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 (EF-2), was zu einer Hemmung der Proteinsynthese und schließlich zum Tod der betroffenen Zelle führt.

Zunächst erfolgte die rekombinante Expression und Aufreinigung von Stv-C3Mut in *E. coli* Bakterien. Um die Bindung der Cargo-Proteine an das Streptavidin des Transporters zu ermöglichen, wurden diese im nächsten Schritt biotinyliert. Um die Interaktion von biotinylierter PARP (bPARP) und Stv-C3Mut näher zu charakterisieren, wurde die Dot Blot Methode angewandt. Hierbei konnte *in vitro* eine stabile Bindung des Transporters an das zu transportierende Protein nachgewiesen werden. Ob bPARP (biotinylierte Poly (ADP-Ribose) Polymerase) durch das Stv-C3Mut Transportsystem in J774A.1 Makrophagen transportiert werden kann, wurde mithilfe einer Digitonin-basierten Zellfraktionierung untersucht. Digitonin verursacht die Bildung kleiner Poren in der Zellmembran, durch die das Zytosol aus den Zellen fließt, während die Zellorganellen in den extrahierten Zellen verbleiben. BPARP konnte in diesen Versuchen

deutlich in den extrahierten Zellen, nicht jedoch im Zytosol der Makrophagen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bPARP durch den Transporter in endosomale Vesikel aufgenommen wird, von hier jedoch nicht weiter in das Zytosol gelangen kann. Eine mögliche Begründung hierfür liegt darin, dass das Cargo-Protein aufgrund seiner Größe nicht durch die Poren in azidifizierten frühen Endosomen passt, durch welche C3Mut typischerweise in das Zytosol tritt. Die Internalisierung von biotinyliertem DTA (bDTA) wurde mit einem Zellviabilitätstest untersucht. Hierbei zeigte sich, verglichen mit den Kontrollen, eine signifikante Reduzierung der Viabilität bei den Zellen, die mit Stv-C3Mut und bDTA zusammen inkubiert wurden. Diese ist auf den erfolgreichen Transport von bDTA durch den Stv-C3Mut Transporter in das Zytosol der J774A.1 Makrophagen zurückzuführen.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich das Stv-C3Mut Transportsystem für den selektiven Transport von Proteinen in das Zytosol von Makrophagen eignet, dies jedoch nicht für alle Cargo-Proteine gilt. Besonders die Größe des Proteins scheint hier ein entscheidender Faktor zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Aktories, K., Jung, M., Böhmer, J., Fritz, G., Vandekerckhove, J., Just, I. Studies on the active-site structure of C3-like exoenzymes: involvement of glutamic acid in catalysis of ADP-ribosylation. *Biochimie* 77: 326–332 (1995)
2. Aktories, K., Weller, U., Chhatwal, G.S. Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett.* 212: 109–113 (1987)
3. Aktories, K., Wilde, C., Vogelsgesang, M. Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152: 1–22 (2004)
4. Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R., Stiles, B.G. Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common Clostridium and Bacillus Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 373–402 (2004)
5. Barth, H., Blöcker, D., Aktories, K. The uptake machinery of clostridial actin ADP-ribosylating toxins--a cell delivery system for fusion proteins and polypeptide drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366: 501–512 (2002)
6. Barth, H., Blöcker, D., Behlke, J., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Benz, R., Aktories, K. Cellular Uptake of Clostridium botulinum C2 Toxin Requires Oligomerization and Acidification. *J. Biol. Chem.* 275: 18704–18711 (2000)
7. Barth, H., Stiles, B.G. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr. Med. Chem.* 15: 459–469 (2008)
8. Böhmer, J., Jung, M., Sehr, P., Fritz, G., Popoff, M., Just, I., Aktories, K. Active site mutation of the C3-like ADP-ribosyltransferase from Clostridium limosum--analysis of glutamic acid 174. *Biochemistry* 35: 282–289 (1996)
9. Bouchard, V.J., Rouleau, M., Poirier, G.G. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 31: 446–454 (2003)
10. Bustelo, X.R., Sauzeau, V., Berenjano, I.M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29: 356–370 (2007)

11. Caron, E., Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282: 1717–1721 (1998)
12. Chaitanya, G.V., Steven, A.J., Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal* 8: 31 (2010)
13. Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J* 8: 1087–1092 (1989)
14. Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J., Eisenberg, D. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357: 216–222 (1992)
15. Christow, H., Lillich, M., Sold, A., Fahrer, J., Barth, H. Recombinant streptavidin-C3bot for delivery of proteins into macrophages. *Toxicon* 75: 144–147 (2013)
16. Collier, R.J. Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: Inactivation of one of the transfer factors. *Journal of Molecular Biology* 25: 83–98 (1967)
17. Collier, R.J. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 39: 54–85 (1975)
18. Collier, R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39: 1793–1803 (2001)
19. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342: 249–268 (1999)
20. Etienne-Manneville, S., Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629–635 (2002)
21. Fahrer, J., Kuban, J., Heine, K., Rupps, G., Kaiser, E., Felder, E., Benz, R., Barth, H. Selective and specific internalization of clostridial C3 ADP-ribosyltransferases into macrophages and monocytes. *Cell. Microbiol.* 12: 233–247 (2010a)
22. Fahrer, J., Plunien, R., Binder, U., Langer, T., Seliger, H., Barth, H. Genetically engineered clostridial C2 toxin as a novel delivery system for living mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* 21: 130–139 (2010b)

23. Fahrner, J., Rieger, J., van Zandbergen, G., Barth, H. The C2-streptavidin delivery system promotes the uptake of biotinylated molecules in macrophages and T-leukemia cells. *Biol. Chem.* 391: 1315–1325 (2010c)
24. Fujihara, H., Walker, L.A., Gong, M.C., Lemichez, E., Boquet, P., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol. Biol. Cell* 8, 2437–2447 (1997)
25. Gabliks, J., Falconer, M. Interaction of diphtheria toxin with cell cultures from susceptible and resistant animals. *J Exp Med* 123: 723–732 (1966)
26. Gabliks, J., Solotorovsky, M. Cell culture reactivity to diphtheria, Staphylococcus, tetanus and Escherichia coli toxins. *J. Immunol.* 88: 505–512 (1962)
27. Genth, H., Gerhard, R., Maeda, A., Amano, M., Kaibuchi, K., Aktories, K., Just, I. Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J. Biol. Chem.* 278: 28523–28527 (2003)
28. Gill, D.M., Pappenheimer, A.M. Structure-Activity Relationships in Diphtheria Toxin. *J. Biol. Chem.* 246: 1492–1495 (1971)
29. Han, S., Arvai, A.S., Clancy, S.B., Tainer, J.A. Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum: structural insights for recognition specificity and catalysis. *J. Mol. Biol.* 305: 95–107 (2001)
30. Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 243: 3553–3555 (1968)
31. Inoue, S., Sugai, M., Murooka, Y., Paik, S.Y., Hong, Y.M., Ohgai, H., Suginaka, H. Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from Staphylococcus aureus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 459–464 (1991)
32. Just, I., Mohr, C., Schallehn, G., Menard, L., Didsbury, J.R., Vandekerckhove, J., Damme, J. van, Aktories, K. Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by Clostridium limosum. *J. Biol. Chem.* 267: 10274–10280 (1992a)

33. Just, I., Schallehn, G., Aktories, K. ADP-ribosylation of small GTP-binding proteins by *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 931–936 (1992b)
34. Kim, M.Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J.T., Kraus, W.L. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119: 803–814 (2004)
35. Kochi, S.K., Collier, R.J. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 208: 296–302 (1993)
36. Kraus, W.L. Transcriptional Control by PARP-1: Chromatin Modulation, Enhancer-binding, Coregulation, and Insulation. *Curr Opin Cell Biol* 20: 294–302 (2008)
37. Krishnakumar, R., Kraus, W.L. The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol Cell* 39: 8–24 (2010)
38. Laitinen, O.H., Hytönen, V.P., Nordlund, H.R., Kulomaa, M.S. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 2992–3017 (2006)
39. Lamarche, N., Hall, A. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* 10: 436–440 (1994)
40. Lencer, W.I., Tsai, B. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* 28: 639–645 (2003)
41. Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317–325 (2011)
42. Lillich, M., Chen, X., Weil, T., Barth, H., Fahrner, J. Streptavidin-conjugated C3 protein mediates the delivery of mono-biotinylated RNase A into macrophages. *Bioconjug. Chem.* 23: 1426–1436 (2012)
43. Macfarlane, M.G., Knight, B.C.J.G. The biochemistry of bacterial toxins. *Biochem J* 35: 884–902 (1941)
44. Middlebrook, J.L., Dorland, R.B. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* 48: 199–221 (1984)

45. Nemoto, Y., Namba, T., Kozaki, S., Narumiya, S. Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase gene. Cloning, sequencing, and expression of a functional protein in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 266: 19312–19319 (1991)
46. Ness, B.G.V., Howard, J.B., Bodley, J.W. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* 255: 10717–10720 (1980)
47. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* 11: 545–554 (1999)
48. Pappenheimer, A.M. Diphtheria toxin. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 69–94 (1977)
49. Pardridge, W.M. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1: 131–139 (2002)
50. Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., Hall, A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111: 1001–1007 (1990)
51. Phillips, D.C. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. *PNAS* 57: 483–495 (1967)
52. Popoff, M.R., Hauser, D., Boquet, P., Eklund, M.W., Gill, D.M. Characterization of the C3 gene of Clostridium botulinum types C and D and its expression in Escherichia coli. *Infect Immun* 59: 3673–3679 (1991)
53. Raines, R.T. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98: 1045–1066 (1998)
54. Rohrbeck, A., Schröder, A., Hagemann, S., Pich, A., Höltje, M., Ahnert-Hilger, G., Just, I. Vimentin mediates uptake of C3 exoenzyme. *PLoS ONE* 9 (2014a)
55. Rohrbeck, A., von Elsner, L., Hagemann, S., Just, I. Binding of Clostridium botulinum C3 exoenzyme to intact cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 387: 523–532 (2014b)
56. Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M. Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action. *J. Biochem.* 136: 569–574 (2004)
57. Sandvig, K., Olsnes, S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* 87: 828–832 (1980)

58. Sano, T., Pandori, M.W., Chen, X., Smith, C.L., Cantor, C.R. Recombinant Core Streptavidins - a minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J. Biol. Chem.* 270: 28204–28209 (1995)
59. Schmidt, A., Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 16: 1587–1609 (2002)
60. Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., Aktories, K. Glucosylation and ADP-ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 37: 5296–5304 (1998)
61. Sekine, A., Fujiwara, M., Narumiya, S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264: 8602–8605 (1989)
62. Strauss, N., Hendee, E.D. The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. *J Exp Med* 109: 145–163 (1959)
63. Vogelsgesang, M., Pautsch, A., Aktories, K. C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 374: 347–360 (2007)
64. Wilde, C., Chhatwal, G.S., Schmalzing, G., Aktories, K., Just, I. A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J. Biol. Chem.* 276: 9537–9542 (2001)
65. Wilson, B.A., Reich, K.A., Weinstein, B.R., Collier, R.J. Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry* 29: 8643–8651 (1990)
66. Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K., Ohara, M., Komatsuzawa, H., Sugai, M. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect. Immun.* 69: 7760–7771 (2001)
67. Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259–263 (2002)

III. Danksagung

Ich danke ganz herzlich

...Prof. Dr. Holger Barth für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung.

...Prof. Dr. Bernd Knöll für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit.

...Dr. Maren Lillich für ihre enge Betreuung, Anleitung, Hilfe und für ihre Geduld.

...Katharina Ernst für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft.

...Ulrike Binder, Dr. Lydia Dmochewitz und Dr. Christina Förtsch für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre im Labor der AG Barth.

...Maurice Röder, Manuel Schuster und Simon Langer für gute Laune und gegenseitige Unterstützung während der Zeit im Labor.

...dem Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“ der internationalen Graduiertenschule der Universität Ulm für die Gewährung eines Stipendiums.

...Barbara Seibold für das Korrekturlesen der Dissertation und für die oft nötige Motivation während des Schreibens. Danke, dass es dich gibt!

...meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung auf meinem Lebensweg.

IV. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Alexander Sold
Adresse:
Telefon:
e-mail-Adresse:
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdaten: 31.10.1986 in Aalen

Hochschulausbildung

15.10.2007 – 13.05.2014 Studium im Fach Humanmedizin an der Universität Ulm
14.09.2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0 bestanden
Seit 1.10.2011 Promotion mit dem Thema „Transport biotinylierter Proteine in das Zytosol von Makrophagen mithilfe des C3Mut-Streptavidin Transportsystems“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Ulm.
Abgabe der Dissertation im Januar 2015 geplant.
13.05.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,5 bestanden.
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,66
11.11.2014 Approbation als Arzt

Famulaturen

22.02. – 23.03.2010 Medizinische Klinik II (Kardiologie), Ostalbklinikum Aalen
20.09. – 17.10.2010 Klinik für Innere Medizin I (Gastroenterologie), Universitätsklinik Ulm

01.08. – 04.09.2011 Klinik für Innere Medizin III (Hämatologie/Onkologie),
Universitätsklinik Ulm

10.09. – 09.10.2012 Praxis für Neurologie bei Prof. Dr. Herbert Schreiber,
Ulm

Praktisches Jahr

25.02. – 14.06.2013 1. Terial: Chirurgie, Klinikum Heidenheim

17.06. – 04.10.2013 2. Terial: Innere Medizin, Kantonsspital Luzern

07.10.2013 – 26.01.2014 3. Terial: Radiologie, Klinikum Heidenheim

Schulische Ausbildung

1993 – 1997 Grundschule an der Talschule Wasseralfingen

1997 - 2006 Kopernikus Gymnasium Wasseralfingen

Abschluss: Abitur mit der Note 1,3

Zivildienst

04.09.2006 – 31.05.2007 Kindergarten der Lebenshilfe für Menschen mit geistiger
Behinderung, Kreisvereinigung Aalen e.V.