

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz**

**„*Escherichia coli* α -Hämolysin: Untersuchungen zur
Struktur und Porenbildung“**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ricarda Reinartz
geb. am 17.11.1980 in Rheinbach

Mainz, 8.12.2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung

1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Bakterielle Toxine	1
1.3 Porenbildende Toxine	2
1.4 RTX-Proteine	6
1.5 Das <i>Escherichia coli</i> α-Hämolysin	7
1.5.1 Die Wirkungsweise von HlyA	8
1.5.2 Die Struktur von HlyA	9
1.5.3 Porenbildung durch HlyA	10
1.5.4 Die Modifikation von HlyA: HlyC	11
1.5.5 Sekretion von HlyA: HlyB und HlyC	12
1.6 Ziel der Arbeit	

Kapitel 2: Material und Methoden

2.1 Chemikalien und andere Materialien	15
2.2 Gerätenachweis	16
2.3 Bakterienstämme und Zelllinien	17
2.4 Stammhaltung und Medien	17
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.2 HaCaT-Zellen	18
2.5 Plasmide	18
2.6 Oligonukleotide	19
2.7 Sterilisationsverfahren und Entsorgung von Bakterienstämmen	20
2.8 Methoden	20
2.8.1 Messung intrazellulären ATPs	20
2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly (1979)	21
2.8.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.8.4 Zielgerichtete Mutagenese	23
2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.8.6 Gelelektion mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder peqGold Gel Extraction Kit	24
2.8.7 Restriktion von DNA	25
2.8.8 Dephosphorylierung von DNA	25
2.8.9 Ligation	26
2.8.10 Bestimmung von OD und Proteinkonzentration	26
2.8.11 Herstellung kompetenter Zellen	27
2.8.12 Transformation kompetenter Zellen	27
2.8.13 Aufreinigung des α -Hämolysins aus <i>Escherichia coli</i>	28
2.8.14 Untersuchung der hämolytischen Aktivität im Hämolysetiter	29
2.8.15 Untersuchung der hämolytischen Aktivität auf Blutagar	29
2.8.16 Osmo-Protektion (Schutzversuche)	29
2.8.17 SH-spezifische Markierung von HlyA	30
2.8.18 Gewinnung von Ghosts aus Kaninchen-Erythrozyten	31
2.8.19 Gewinnung von Ghosts aus Human-Erythrozyten	31
2.8.20 Toxin-Membran-Interaktionsstudien mit cysteinsubstituiertem HlyA	31
2.8.21 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)	32
2.8.22 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	33
2.8.23 Westernblot und Immundetektion	33
2.8.24 Coimmunpräzipitation („Pull-down Assay“)	35
2.8.25 Herstellung künstlicher Liposomen	36

2.8.26 Vernetzen von Toxinen auf Liposomen durch Einsatz von Crosslinkern	36
2.8.27 Herstellung calceingefüllter Liposomen	37
2.8.28 Calceinfreisetzung aus Liposomen	37
2.8.29 Bindungsstudien von HlyA an Erythrozytenmembranen	38

Kapitel 3: Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Porenbildung durch α-Hämolysin	39
3.1.1 Untersuchung der möglichen Oligomerisierung von HlyA durch Mischen unterschiedlicher HlyA-Derivate	39
3.1.2 Coimmunpräzipitation (Pull-down Assay)	41
3.1.3 Einsatz von Crosslinkern	43
3.2 Charakterisierung der N-terminalen Region von α-Hämolysin	46
3.2.1 Charakterisierung der Mutanten HlyA- Δ 20-40 und HlyA- Δ 1-50	47
3.2.2 Charakterisierung der Mutante HlyA- Δ 1-100	50
3.2.3 Untersuchung möglicher Interaktionen des N-Terminus mit Membranen	52
3.3 Charakterisierung putativ porenbildender Regionen von α-Hämolysin	56
3.3.1 Charakterisierung von Doppelprolinsubstituierten HlyA-Derivaten zur Identifizierung möglicher porenbildender Regionen in HlyA	56
3.3.2 Untersuchung eingeschränkt lytischer und nicht-lytischer doppelprolin-substituierter HlyA-Derivate in Bezug auf die porenbildende Region 272 bis 298	60
3.3.3 Membran-Interaktionsstudien essentieller, putativ α -helicaler Aminosäure-Bereiche	61

Kapitel 4: Diskussion

4.1 Der Prozess der Porenbildung durch α-Hämolysin beinhaltet keine Oligomerisierung	64
4.2 Charakterisierung des N-Terminus von <i>Escherichia coli</i> α-Hämolysin	67
4.2.1 Die Aminosäuresequenz 1 bis 55 ist nicht essentiell für die Porenbildung, interagiert aber mit der Zielmembran	67
4.2.2 Die Deletion der 100 N-terminalen Aminosäuren führt zu einer starken Beeinträchtigung der lytischen Aktivität von HlyA	69
4.3 Identifizierung putativ porenbildender α-Helices	70
4.4 Ausblick	74

Zusammenfassung	76
------------------------	-----------

Literaturverzeichnis	77
-----------------------------	-----------

Anhang

Abkürzungsverzeichnis	85
Abbildungsverzeichnis	86
Tabellenverzeichnis	87

1. Einleitung

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, die der Gamma Gruppe der Proteobakterien zugeordnet wird. *Escherichia coli* ist ein fakultativ anaerober Vertreter der Enterobacteriaceae, dessen natürliches Habitat der Darm von Menschen und warmblütigen Tieren ist. Von medizinischer Bedeutung sind intestinal pathogene Stämme, die nicht zur normalen Darmflora gehören und Durchfallerkrankungen bis hin zur Colitis und Dysenterie hervorrufen, sowie extraintestinal pathogene Stämme; diese verursachen im Intestinaltrakt keine Erkrankungen, können aber extraintestinal zu Infektionen wie Meningitis und Sepsis sowie Infektionen des Urogenitaltrakts führen. Intestinal pathogene *E. coli* werden anhand ihrer Virulenzfaktoren in sieben Pathotypen unterteilt: Enterohämorrhagische (EHEC), enteropathogene (EPEC), enterotoxinbildende (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), diffus adhärenz (DAEC) und adhärenz invasive (AIEC) *E. coli* (Rendon et al.; 2007, Shpigel et al., 2008; Barnich & Darfeuille-Michaud, 2007). Bei den extraintestinal pathogenen Vertretern werden als wichtigste Pathotypen uropathogenische *E. coli* (UPEC) als Erreger der Urogenitaltraktsinfektionen und Meningitis/Sepsis assoziierte *E. coli* (MNEC) unterschieden. Infektionen des Urogenitaltrakts gehören zu den häufigsten bakteriellen Infektionen beim Menschen, wobei vor allem Frauen betroffen sind; etwa 90% dieser Infektionen werden durch UPEC hervorgerufen (Johnson & Stamm, 1989). Eine Urogenitaltraktsinfektion (UTI) ist definiert als erhöhte Bakterienkonzentration im Urin (Stamm, 1982), und kann auch asymptomatisch (asymptomatische Bakteriuria) verlaufen. Bei symptomatischen Bakteriuria unterscheidet man die Cystitis, wenn die Infektion sich auf die Blase beschränkt, und die Pyelonephritis, wenn auch die Nieren betroffen sind. Auffällig bei UPEC ist die hohe Zahl unterschiedlicher und unterschiedlich kombinierter Virulenzfaktoren bei den verschiedenen Isolaten (Johnson et al., 1998; Marrs et al., 2005). Die am häufigsten auftretenden Virulenzfaktoren sind Fimbrien zur Adhäsion bei mehr als 80 % der isolierten UPEC-Stämme, Siderophore zur Eisenversorgung, und die zur Zellyse führenden Toxine α - und β -Hämolysin sowie CNF (cytotoxic necrotising factor) (Kucheria et al., 2005).

1.2 Bakterielle Toxine

Toxine sind von ihrem Produzenten hergestellte Verbindungen, die grundlegende zelluläre Prozesse anderer Organismen stören oder schädigen, und diese somit stark beeinträchtigen oder töten. Bei pathogenen Bakterien stellen die Toxine häufig wichtige Virulenzfaktoren dar, die das Krankheitsbild hervorrufen oder zu diesem beitragen. Die bakteriellen Toxine werden unterteilt in Endo- und Exotoxine. Bei den Endotoxinen handelt es sich um einen Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, den Lipopolysacchariden, die in der Regel

bei der Lyse der Zelle freigesetzt werden. Exotoxine sind Peptide oder Proteine, die während des Wachstums der Organismen aktiv in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt werden. Die meisten Exotoxine lassen sich drei großen Gruppen zuordnen: *Cytolytische Toxine* lysieren Zellen durch die Bildung von Poren in der Zellmembran oder den enzymatischen Angriff auf Membranbausteine wie Phospholipide. *A-B-Toxine* bestehen aus zwei Untereinheiten, wobei die B-Untereinheit in der Regel an die Zielzelle bindet und den Eintritt der enzymatisch aktiven A-Untereinheit in die Zelle vermittelt. *Superantigentoxine* führen zur Stimulation von Immunzellen und rufen dadurch massive Entzündungsreaktionen hervor.

Die Freisetzung von Exotoxinen erfolgt durch Sekretion. Bei Bakterien werden fünf Sekretionssysteme (I-V) unterschieden, die wiederum in das Sec-abhängige und das Sec-unabhängige System unterteilt werden. Bei der Sec-abhängigen Sekretion (II und V) erfolgt die Translokation des Proteins über die Cytoplasmamembran durch Proteine der Sec-Transportmaschinerie. Das für den Export bestimmte Protein benötigt ein Signalpeptid, das im Verlauf der Sekretion abgespalten wird. Der Transport über die äußere Membran gramnegativer Bakterien ist ein zweiter, unabhängiger Schritt der Sekretion. Bei der Sec-unabhängigen Sekretion (I, III und IV) dagegen erfolgt die Translokation über die innere und die äußere Membran in einem Schritt. Der Transport über die innere Membran wird hierbei durch zur ABC-Familie gehörende Proteine vermittelt, und ist in der Regel substratspezifisch.

1.3 Porenbildende Toxine

Porenbildende Toxine (PFTs, Poreforming toxins) sind die größte bekannte Klasse bakteriell gebildeter Exotoxine. Durch ihre porenbildende Funktion verursachen sie Schädigungen der Zellmembran und Störungen des Membranpotenzials von Zellen, die zur Lyse der betroffenen Zelle führen. Neben bakteriellen Toxinen sind auch einige porenbildende Toxine höherer Organismen wie z. B. Cnidarien, Seeanemonen, Würmern und Pilzen bekannt (Sher et al.; 2005, Sousa et al.; 1994, Kem, 1994; Canicatti & Roch, 1993; Mancheno et al., 2005). Die Proteine werden in wasserlöslicher Form von ihrem Produzenten sekretiert, und multimerisieren im Allgemeinen in einer amphipathischen Struktur, die spontan in die Zellmembran inseriert und die hydrophile Pore bildet. Diese Fähigkeit des Konvertierens von der löslichen in die porenbildende Form ist die gemeinsame Eigenschaft aller bekannten porenbildenden Toxine. Die meist verbreitete Art der Klassifizierung von porenbildenden Toxinen beruht auf der Struktur der porenbildenden Region. Unterschieden wird hierbei zwischen α -PFTs mit α -helicaler Transmembranregion und β -PFTs mit membraninserterender β -Faltblattsstruktur.

α -PFTs: α -PFTs besitzen hydrophobe, α -helicale porenbildende Domänen. Die Porenbildung beinhaltet Bindung, Konformationsänderung und Insertion des Toxins (Tilley & Saibil, 2006); ein allgemein gültiger Mechanismus ist jedoch nicht bekannt (Iacovache et al.,

2008). Die am besten charakterisierten α -PFTs sind von *Escherichia coli* gebildete porenbildende Colicine, die bakterizid auf verwandte *Escherichia coli* wirken (Cascales et al., 2007). Neben porenbildenden Colicinen sind auch Colicine mit anderen bakteriziden Funktionen bekannt (Lakey et al., 2001; Cascales et al., 2007). Die Poren von Colicinen werden durch Oligomerisierung und Insertion von bis zu zehn α -Helices gebildet (Lakey et al., 2001; Parker et al., 1990). Weitere gut untersuchte α -PFTs sind die von Seeanemonen produzierten Actinoporine, die ihre etwa zwei Nanometer großen Poren durch Tetramerisierung bilden; jedes Monomer besitzt eine N-terminale, porenbildende α -Helix (Kristan et al., 2004).

Im Gegensatz zu diesen gut untersuchten α -PFTs ist im Fall der Mitglieder der RTX (Repeat in toxin)-Familie, die durch die calciumbindenden RTX-Domänen charakterisiert sind, lediglich bekannt, dass die porenbildende Struktur aus α -Helices besteht; die Frage der Anzahl porenbildender Helices innerhalb eines Moleküls und der Oligomerisierung ist nicht eindeutig geklärt. Für das *Bordetella pertussis* Adenylat Cyclase Toxin wurden fünf putativ porenbildende α -Helices und eine oligomere Porenbildung postuliert (Iwaki et al., 1995; Lee et al., 2005), für das *Escherichia coli* α -Hämolyysin dagegen acht putativ porenbildende α -Helices (Ludwig et al., 1991), und unterschiedliche Aussagen in Bezug auf die Porenbildung als Monomer (Bhakdi et al., 1986; Menestrina et al., 1987; Menestrina, 1988) oder Oligomer (Benz et al., 1989; Ludwig et al., 1993).

β -PFTs: Die Pore der β -PFTs wird von β -Faltblättern, angeordnet in einem β -Barrel, gebildet. β -Barrels sind große, membranspannende Faltblattstrukturen, bei denen die β -Faltblätter antiparallel angeordnet sind, und einen hydrophoben Kern im Innern des Barrels bilden. Die Monomere der PFTs multimerisieren in zirkuläre Polymere, wobei die Zahl der Moleküle stark variiert. Im Fall des Aerolysins aus *Aeromonas* spp. und des α -Toxins aus *Staphylococcus aureus* besteht das Oligomer aus sieben Toxinmolekülen (Wilmsen et al., 1992; Moniatte et al., 1996; Gouaux et al., 1994). Bei α -Toxin bildet die porenformende Region ein antiparalleles β -Barrel, bei dem polare und nicht polare Aminosäuren alternieren; die polaren Aminosäuren ragen in die Membran der Zielzelle, die nicht polaren begrenzen das Lumen der Pore (Valeva et al., 1996; Valeva et al., 1997). Andere β -PFTs bilden ihre Poren durch Multimerisierung von bis zu 50 Monomeren, wie im Fall von Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* und Perfringolysin O (PFO) aus *Clostridium perfringens* (Walev et al., 2001; Olofsson et al., 1993). Diese beiden Toxine werden der größten bekannten Klasse der PFTs zugeordnet, den cholesterolabhängigen Cytolysinen (cholesterol dependent cytolysins, CDC), die eine Ähnlichkeit der Sequenz von 40-80% aufweisen (Tveten et al., 2005). Die Poren der cholesterolabhängigen Cytolysine erreichen Durchmesser von bis zu 50 nm, im Vergleich zu ca. zwei nm bei Aerolysin und dem *Staphylococcus aureus* α -Toxin.

Posttranslationale Aktivierung: Häufig ist der Prozess der Porenbildung abhängig von einer posttranslationalen Aktivierung des Protoxins. Die Aktivierung von Pro-Aerolysin erfolgt z.B. proteolytisch durch Proteasen des Darms, *Aeromonas* Proteasen oder Mitglieder der humanen Furin-Proteasen (Abrami et al., 1998_a; Howard & Buckley, 1985), die eine C-terminale Sequenz, bestehend aus 40 Aminosäuren, abspalten (van der Goot et al., 1992). *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) wird durch Abspaltung eines 14 kDa großen N-terminalen Bereichs von Pro-VCC, u. a. durch zelluläre Metalloproteasen, aktiviert (Valeva et al., 2004). Bei RTX (Repeat in toxin)-Toxinen, zu denen auch das *Escherichia coli* α -Hämolyysin gehört, erfolgt die posttranslationale Aktivierung dagegen modifizierend durch Fettsäureacylierung spezifischer Aminosäuren (Welch, 2001).

Bindung der Toxine an die Zielzelle: Die Bindung der Toxinmoleküle ist bei zahlreichen PFTs rezeptorabhängig. *Staphylococcus aureus* α -Toxin bindet mit größter Wahrscheinlichkeit an die Kopfgruppen geclusterter Lipide (Valeva et al., 2006), Aerolysin an lipidgebundene Proteine (glycosyl-phosphatidylinositol anchored receptors) (Nelson et al.; 1997, Abrami et al., 1998_b). Bei cholesterolabhängigen Cytolysinen wird zwischen Bindung, Oligomerisierung oder Membraninsertion in Abhängigkeit von Cholesterol differenziert (Giddings et al., 2003). Perfringolysin O bindet z.B. direkt an Cholesterol, und die durch die Bindung verursachten konformationellen Änderungen begünstigen die Multimerisierung und somit die Porenbildung. *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O (LLO) und *Streptococcus intermedius* Intermedilysin (ILY) dagegen sind Liganden von CD59, einem GPI (-glycosyl-phosphatidylinositol) verankerten Molekül (Jacobs et al., 1998; Giddings et al., 2004), und benötigen das Cholesterol erst nach der Bindung für die Porenbildung (Soltani et al., 2007). Im Fall von *Escherichia coli* α -Hämolyysin wurde die Bindung an β_2 -Integrin Rezeptoren bei Leukozyten und Glycophorin Erythrozyten beschrieben (Lally et al., 1997; Cortajarena, 2001). Weitere Untersuchungen mit Granulozyten zeigten jedoch, dass der β_2 -Integrin Rezeptor nicht essentiell für Bindung und Porenbildung des Toxins ist (Valeva et al., 2005_b). Auch für die Bindung des *Bordetella pertussis* Adenylat Cyclase Toxins (ACT), dessen Hämolyysin-Domäne eine große Sequenzhomologie zum *Escherichia coli* α -Hämolyysin aufweist, wird ein Rezeptor für die Bindung an die Zielzelle nicht zwingend benötigt (Martín et al., 2004).

Porenbildung: Zwei unterschiedliche Mechanismen der Porenbildung bakterieller PFTs sind bisher bekannt. Im ersten Fall erfolgen Oligomerisierung, Konformationsänderung und Membraninsertion in einem Schritt, ohne dass verschiedene Stadien beobachtet werden; dieser Mechanismus wurde z.B. für Aerolysin nachgewiesen (Iacovache et al., 2006).

Beim zweiten bekannten Mechanismus, der u. a. für *Staphylococcus aureus* α -Toxin (Valeva et al., 1997_{a,b}; Kawate & Gouaux, 2003) und *Vibrio cholerae* Cytolysin (Löhner et al., unpublizierte Daten) nachgewiesen wurde, binden mehrere Moleküle an die Zellmembran,

bilden als Oligomer die so genannte „Präpore“, und inserieren erst dann gemeinsam als porenbildende Struktur in die Zellmembran.

Porenbildende Colicine, die zu den α -PFTs gehören, bilden ihre Pore aus bis zu zehn α -Helices, von denen zunächst nur zwei in die Zielmembran inserieren. Anschließend kommt es durch Insertion der restlichen Helices zur Öffnung der Pore (Lakey et al., 2001; Parker et al., 1990). Bei RTX-Toxinen, die durch calciumbindende RTX (Repeats in toxin)-Domänen charakterisiert sind und ebenfalls zu den α -PFTs gehören, ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob und wann es zur Oligomerisierung kommt. Lediglich für das Adenylat Cyclase Toxin von *Bordetella pertussis* wurde oligomeres Verhalten bereits in Lösung vor der Bindung an die Zielzelle nachgewiesen (Lee et al., 2005), während im Fall von α -Hämolyysin von *Escherichia coli*, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Aussagen über eine mögliche Oligomerisierung existieren (s.o.). Laut Lally et al. (1999) könnte nach der Bindung von RTX-Toxinen die Membraninsertion durch Konformationsänderungen des Toxins in eine nicht-native, intermediäre Form, die so genannte Molten Globule Form, erfolgen.

Rolle von PFTs bei Infektionen: Bisher ist nur wenig darüber bekannt, welchen Vorteil pathogene Bakterien von der Bildung porenbildender Toxine haben. Eine allgemein gültige Erklärung ist möglicherweise die Versorgung mit Eisen, insbesondere im Fall der Lyse von Erythrozyten. Bei einigen Toxinen sind jedoch auch andere Funktionen bekannt: Listeriolysin O vermittelt den Austritt des Bakteriums aus dem Phago lysosom in das Cytoplasma der Wirtszelle und somit den Schutz vor Phagozytose (Cossart & Sansonetti, 2004). Streptolysin O aus *Streptococcus pyogenes* ermöglicht die Translokation des Effektor-Moleküls NAD-Glycohydrolase in das Cytosol der Zielzelle, was wiederum zur Produktion der zyklischen ADP-Ribose und einer cytotoxischen Zellantwort führt (Madden et al., 2001).

Immunantwort des Wirts auf PFTs: Die Immunantwort der Wirtszellen auf verschiedene porenbildende Toxine ist vielfältig, und beinhaltet die Aktivierung zellulärer Reaktionen durch Rezeptoren, osmotischen Stress oder Calcium-Influx, die zur Reparatur der Membran, Überleben der Zelle durch Aktivierung zellulärer Prozesse und Autophagie bis hin zur Apoptose führen.

Ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Infektionen sind zelluläre Rezeptoren der Wirtszellen, die so genannten PRPs (pattern recognition receptors); diese erkennen Pathogen-assoziierte Zielstrukturen, wie spezifische Bestandteile der bakteriellen Zellwand, bakterielle Nukleinsäuren und Flagellen (Scott & Saleh, 2007). Die Rezeptoren werden in zwei Klassen unterteilt: Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind in der Membran verankert, und ihre Ligandenbindedomäne ragt in den extrazellulären Raum oder ins Endosom und erkennt spezifische Moleküle. Die NOD-like Rezeptoren (NLRs) sind cytoplasmatisch lokalisiert (Franchi et al., 2006_b), und werden u. a. durch Behandlung der Zelle mit verschiedenen porenbildenden Toxinen aktiviert. Dabei kommt es zur Bildung

eines Multiproteinkomplexes und Interaktion mit Effektor- und/oder Adaptorproteinen, wodurch letztlich verschiedene zelluläre Reaktionen ausgelöst werden können, u. a. auch die Aktivierung der Caspase-1, die zur Apoptose der Zelle führt (Walev et al., 1995_{a+b}; Walev et al., 2002; Martinon et al., 2005; Franchi et al., 2006_a; Gurcel et al., 2006; Scott & Saleh, 2007). Der NLR-assoziierte Multiproteinkomplex wird als Inflammasom bezeichnet (Martinon et al., 2002). Da die unterschiedlichen PFTs sich in ihrer Sequenz stark voneinander unterscheiden, liegt bei der Aktivierung der NLRs durch PFTs vermutlich ein anderer Mechanismus als der der Ligandenbindung an die Rezeptoren vor.

Neben der möglichen rezeptorabhängigen Zellantwort auf Toxine spielt bei der Porenbildung auch der Ionenhaushalt der Zelle eine Rolle. Durch Kalium-Efflux wird unter sublytischen Konzentrationen verschiedener Toxine, wie Pneumolysin, Streptolysin O und *S. aureus* α -Toxin, die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase beobachtet (Stringaris et al., 2002; Stassen et al., 2003; Husmann et al., 2006; Ratner et al., 2006); der Map-Kinase-Weg ist u. a. an der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose in eukaryontischen Zellen beteiligt. Calciumoszillationen durch Calcium-Influx, nachgewiesen mit dem *Escherichia coli* α -Hämolysin, führen zur Aktivierung von Cytokinen wie I- κ B und NF- κ B und proinflammatorischer Zellantwort (Soderblom et al., 2002; Koschinski et al., 2006).

Eine ganz andere Zellantwort ist für das *Vibrio cholerae* Cytolysin bekannt. Dieses porenbildende Toxin kann die Autophagie betroffener Wirtszellen auslösen (Gutierrez et al., 2007). Autophagie ist ein regulierter Mechanismus der Organellen-Degradation, und dient u. a. dem Überleben der Zelle bei Versorgungsdefiziten oder Stress.

Membranreparatur: Im Falle einiger PFTs wurde eine Reparatur der geschädigten Zellmembran durch die Zielzelle nachgewiesen. Nach Porenbildung durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin wird die Membran beispielsweise durch Endozytose der porenbildenden Struktur repariert (Walev et al., 1994; Husmann, unpublizierte Daten), ebenso wie bei Streptolysin O (Walev et al., 2001; Idone et al., 2008). Auch gebundenes nicht-oligomerisiertes Streptolysin O wird von der Zellmembran entfernt (Walev et al., 1995_a).

Die *Escherichia coli* α -Hämolysin-Pore wird von der Zelle unter sublytischen Toxinkonzentrationen ebenfalls geschlossen (Koschinski et al., 2006). Der Mechanismus ist in diesem Fall bislang unbekannt.

1.4 RTX-Proteine

Die Familie der RTX-Proteine (Repeats in Toxin) ist charakterisiert durch eine variable Anzahl an Nonapeptid-Repeats mit der Consensus-Sequenz LXGGXG(D/N)DX. Diese Repeats binden zweiwertige Kationen, in der Regel Calcium, wodurch eine Stabilisierung der β -helicalen Struktur und eine hydrophobe Konformation des Proteins erreicht werden. Die β -helicale Struktur wird auch als „ β -Rolle“ bezeichnet (Lilie et al., 2000).

RTX-Toxine werden von gramnegativen Bakterien produziert und sind häufig an deren Virulenz beteiligt. RTX-Toxin-produzierende Bakterien gehören u. a. Gattungen wie *Escherichia*, *Actinobacillus*, *Bordetella*, *Proteus* und *Vibrio* an (Lally et al., 1999; Welch, 2001). Prototypen sind z.B. das *Bordetella pertussis* Adenylat Cyclase Toxin und das *Escherichia coli* α -Hämolyisin. Während das *E. coli* α -Hämolyisin ausschließlich als porenbildendes Toxin bekannt ist, besitzt das *B. pertussis* Toxin neben der porenbildenden Domäne (Hämolyisin) zusätzlich die N-terminale, etwa 400 Aminosäuren große Adenylat Cyclase (Glaser et al., 1988; Glaser et al., 1989; Benz et al., 1994). Diese gelangt durch die Pore in die Zielzelle, wo zelluläres ATP zu cAMP abgebaut wird (Glaser et al., 1989; Bellalou et al., 1990). Zudem kommt es unabhängig vom Calcium-Influx durch die Pore zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Fišer et al., 2007).

RTX-Toxine werden von ihren Produzenten cytoplasmatisch durch Fettsäureacylierung spezifischer Aminosäuren von einer Acyltransferase aktiviert, und anschließend sekretiert (Lally et al., 1999). Die Sekretion des Toxins erfolgt durch zwei weitere Proteine und wird durch ein C-terminales Sekretionssignal vermittelt (Coote, 1992); die Sekretionssignale einiger bekannter RTX-Toxine sind aufgrund ihrer homologen Struktur kompatibel (Zhang et al., 1993; Sebo & Ladant, 1993). Die Gene für die Modifikations- und Sekretionsproteine werden gemeinsam mit dem Strukturgen der RTX-Toxine in einem Operon codiert (Coote, 1992).

Abgesehen von RTX-Toxinen sind RTX-Repeats auch von „Antifreeze“ Proteinen (AFPs) aus Bakterien, Arthropoden, Fischen, Pflanzen und Pilzen bekannt (Garnham et al., 2008; Duman, 2001; Graether & Sykes, 2004; Fletcher et al., 2001; Breton et al., 2000; Hoshino et al., 2003). Die Proteine sind stark oberflächenaktiv und senken den Gefrierpunkt wässriger Lösungen, wodurch die Existenz in kalter Umgebung ermöglicht wird.

1.5 Das *Escherichia coli* α -Hämolyisin (HlyA)

Das *Escherichia coli* α -Hämolyisin ist ein α -porenbildendes Toxin und gehört zur Familie der RTX-Proteine. Es wird von ca. 50% der UPEC-Stämme synthetisiert (Andrade & Suassuna, 1988). Codiert wird das Protein von dem Gen *hlyA*, das gemeinsam mit den Genen für die Proteine der posttranslationalen Modifikation und des Transports in dem Operon *hlyCABD* (Abb. 1-1) liegt (Goebel & Hedgpeth, 1982; Felmler et al., 1985; Welch & Pellett, 1988). Das Operon befindet sich auf Plasmiden tierischer Isolate und dem Chromosom humaner uropathogener Isolate (Muller et al., 1983; Welch et al., 1983). Das 107 kDa große α -Hämolyisin, das aus 1024 Aminosäuren besteht (Felmler et al., 1985), wird von *E. coli* als inaktives Protoxin synthetisiert, posttranslational modifiziert und sekretiert.

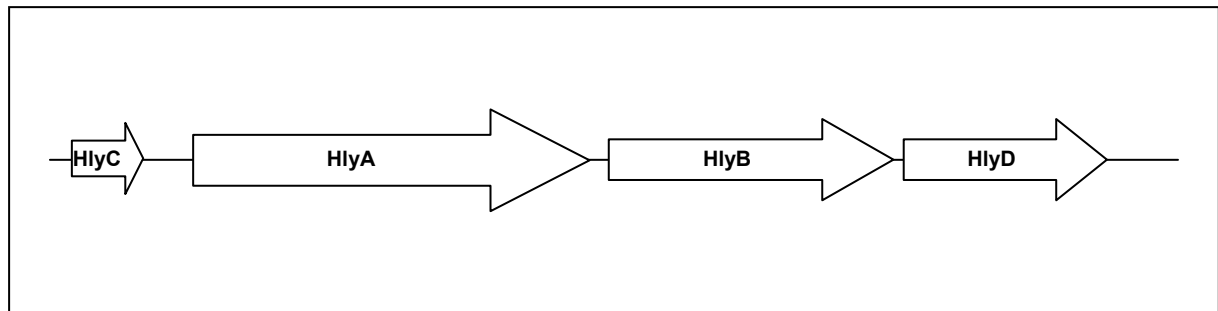


Abb. 1-1: Das Operon *hlyCABD* mit den Genen für Modifikation (*hlyC*), α -Hämolyisin (*hlyA*) und Sekretion (*hlyB* und *hlyD*).

1.5.1 Die Wirkungsweise von HlyA

HlyA wird den α -PFTs zugeordnet, und wirkt cytolytisch auf verschiedene eukaryontische Zelltypen durch Porenbildung in der Zellmembran (Gadeberg & Ørskov, 1984; Bhakdi et al., 1989; Bhakdi et al., 1990; Menestrina et al., 1990; Pellett & Welch, 1996; May et al., 1996). HlyA wird als inaktives Protoxin (proHlyA) gebildet. Die Aktivierung erfolgt im Cytosol posttranslational durch Fettsäureacylierung der Lysine an den Positionen 564 und 590 mit C14- (68%), C15- (26%) und C17- (6%) Carbonfettsäuren (Issartel et al., 1991; Ludwig et al., 1996; Lim et al., 2000; Langston et al., 2004). Die Acylierung wird durch das Genprodukt von *hlyC* katalysiert. Nicht acyliertes Pro-HlyA bindet an Membranen, ist jedoch nicht lytisch aktiv (Bauer & Welch, 1996; Moayeri & Welch, 1997; Sánchez-Magraner et al., 2005). Die Porenbildung ist weiterhin abhängig von zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} oder Sr^{2+} , die in der zweiten Hälfte des Toxins an die Glycin-Asparagin-reichen RTX-Repeats gebunden werden (Boehm et al., 1990; Döbereiner et al., 1996; Goni & Ostalaza, 1998). Es werden verschiedene Arten der Interaktion von HlyA mit der Membran unterschieden: Die reversible Adsorption, die irreversible, nicht-lytische Insertion, und die Porenbildung (Bauer & Welch, 1996; Bakás et al., 1996; Sánchez-Magraner et al., 2006). Bindung und nicht-lytische Insertion des Toxins können im Gegensatz zur Porenbildung unabhängig von zweiwertigen Kationen erfolgen (Bauer & Welch, 1996; Schindel et al., 2001; Valeva et al., 2005_b; Sánchez-Magraner et al., 2007). Für eine lytische Insertion muss die Calciumbindung an die RTX-Domäne bereits vor der Bindung des Toxins an die Zielzelle erfolgen (Ostolaza & Goni, 1995). Weitere Faktoren, welche die lytische Aktivität von HlyA beeinflussen, sind Temperatur und Inkubationszeit (Eberspächer et al., 1989). Die durch HlyA gebildeten Poren sind spannungsabhängig und Kationen-selektiv (Menestrina et al., 1987; Benz et al., 1989); und ihre Größe variiert laut Moayeri & Welch (1994) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Toxinkonzentration von 0,6-1,2 nm. Es wurde beschrieben, dass die HlyA-Poren Calcium-Oszillationen in der Zielzelle auslösen, die zelluläre Reaktionen wie Induktion der proinflammatorischen Cytokine Interleukin 6 und Interleukin 8 bewirken (Uhlén et al., 2000; Laestadius et al., 2002; Söderblom et al., 2002). Anders als zunächst angenommen handelt

es sich dabei jedoch nicht um nicht um eine Zellantwort auf das Toxin durch Deregulation von Calciumkanälen, sondern vielmehr um einen Calcium-Influx durch die Pore (Koschinski et al., 2006). Die Aktivität von HlyA hängt teilweise mit der Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) der bakteriellen Membran zusammen. HlyA und LPS bilden einen Komplex, durch den die HlyA-Konformation vermutlich stabilisiert wird (Bauer & Welch, 1997; Herlax et al., 2005). Eine weitere mögliche Funktion des Komplexes ist die Bindung an die Zielmembran über den LPS-Rezeptor TLR4 (Månsson et al., 2007).

1.4.2 Die Struktur von HlyA

Die Struktur von HlyA (Abb. 1-2) wird in der N-terminalen Hälfte (AS 1 bis etwa 416) von hydrophoben α -Helices dominiert, die an der Porenbildung beteiligt sind (Ludwig et al., 1987; Ludwig et al., 1991; Schindel et al., 2001). Die Aminosäuren 272 bis 298 bilden eine membranspannende, amphipathische α -Helix, die direkt in die Porenbildung involviert ist (Valeva et al., 2008, Abb. 1-3); neben dieser α -Helix wird die direkte Beteiligung weiterer α -Helices an der porenbildenden Struktur erwartet. Die zweite Hälfte des Toxins besteht aus den beiden für die Porenbildung bedeutenden Acylierungsstellen Lysin 564 und 590 (Stanley et al., 1994), einer Glycophorinbindedomäne im Bereich der Aminosäuren 914-936 (Cortajarena et al., 2001), 11-17 RTX-Repeats (Boehm et al., 1990; Sánchez-Magraner et al., 2007) und dem C-terminalen Sekretionssignal (Felmlee & Welch, 1988; Holland et al., 1990).

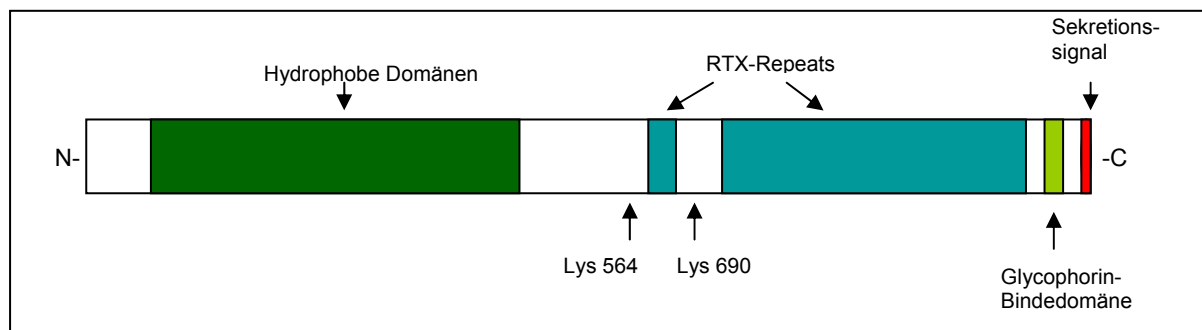


Abb. 1-2: Schematische Darstellung von HlyA. Die N-terminale Hälfte des Proteins besteht überwiegend aus hydrophoben α -Helices. In der C-terminalen Hälfte finden sich die beiden Lysine, die posttranslational fettsäureacyliert werden, 17 RTX-Repeats, die Calcium-Ionen binden, sowie eine Glycophorin-Bindedomäne und das Sekretionssignal für den ABC-Transporter HlyB.

Die Calciumbindung der RTX-Repeats führt zu einer kompakteren β -Faltblatt-Struktur der RTX-Domäne, die sich auf die Konformation der hydrophoben N-terminalen Hälfte des Toxins auswirkt, und dadurch die Porenbildung ermöglicht (Goñi & Ostalaza, 1998; Sánchez-Magraner et al., 2007). Darüber hinaus können die Glycin-Asparagin-reichen RTX-Repeats unabhängig von Calciumionen mit Membranen interagieren (Sánchez-Magraner et al., 2007).

Das C-terminale Sekretionssignal von HlyA weist ein Helix-Turn-Helix Motiv gefolgt von einem Faltblatt-Loop-Faltblatt Motiv auf; diese Struktur ist charakteristisch für das Sekretionssignal verschiedener RTX-Toxine, weshalb die Sekretionssignale teilweise ohne Funktionsverlust gegeneinander austauschbar sind (Zhang et al., 1993).

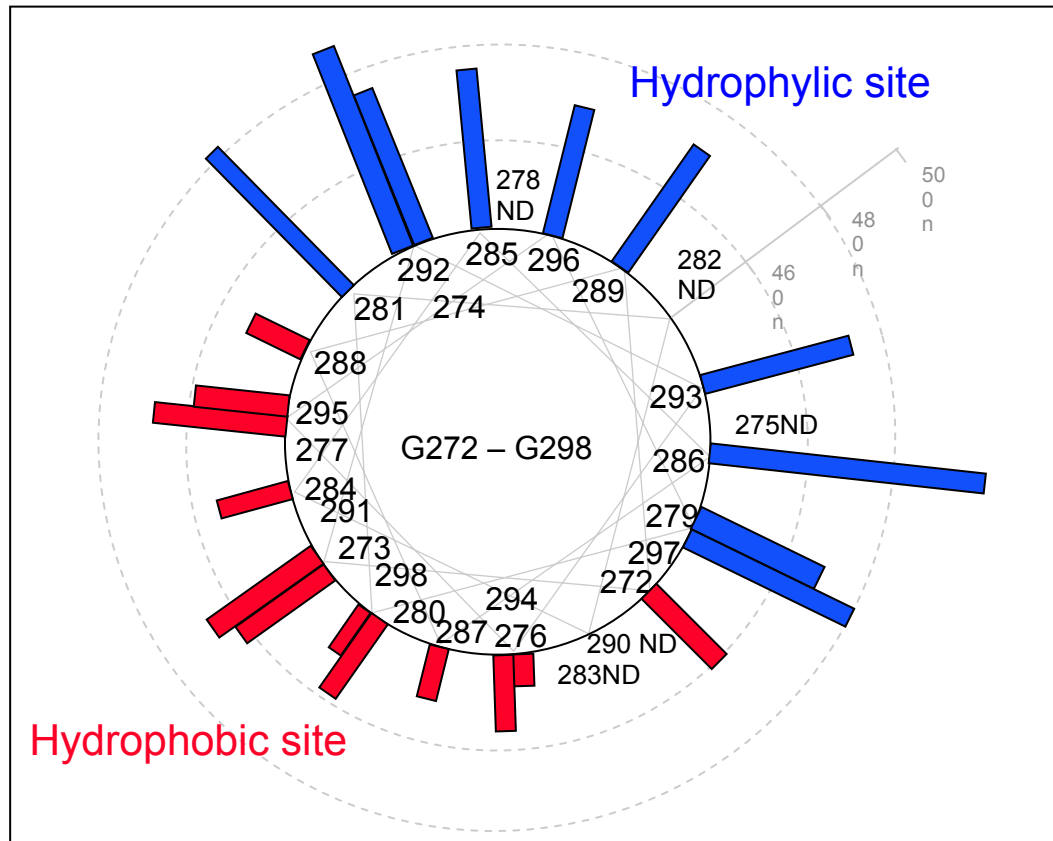


Abb. 1-3: Porenbildende Region von HlyA. Die Aminosäuren 272-298 wurden durch Fluoreszenzspektrometrische Messungen auf ihre Interaktion mit Erythrozytenmembranen untersucht. Dargestellt ist die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums badanmarkierter Aminosäuren durch die Interaktion mit Membranen. Die Periodizität der gemessenen Spektren zeigt die α -helicale Struktur der Region, bei der ein Teil der Aminosäuren in der hydrophoben Membran verankert ist, während der andere Teil in die hydrophile Pore ragt. ND= not determined (nicht bestimmt) Quelle: Valeva et al., 2008

1.5.3 Porenbildung durch HlyA

Die Porenbildung vieler Toxine beinhaltet die Bindung an Rezeptoren, Oligomerisierung und Membraninsertion. Für HlyA wurde die Bindung an die Zielzelle über Glycophorin bei Erythrozyten und über N-verknüpfte Oligosaccharide an β_2 -Integrin Rezeptoren bei Leukozyten beschrieben (Cortajarena, 2001; Lally et al., 1997; Morova et al., 2008). Die Rezeptoren sind jedoch, im Gegensatz zu vielen anderen porenbildenden Toxinen, für die Bindung nicht essentiell; Valeva et al. (2005) wiesen die β_2 -Integrin unabhängige Bindung von HlyA an Granulozyten nach, und zahlreiche Publikationen postulierten die rezeptorunabhängige Bindung, Insertion und Porenbildung des Toxins bei künstlichen Lipidmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung (Ostolaza et al., 1993; Menestrina et al., 1994; Hyland et al., 2001).

HlyA existiert in drei Formen: als Aggregate unterschiedlicher Größe, als Monomer und als membrangebundenes Toxin (Ostolaza et al., 1997). In Lösung liegt ein Gleichgewicht zwischen Aggregat und Monomer vor. Die Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des Aggregats reduziert die lytische Aktivität des Toxins (Cortajarena et al., 2002), d.h. es handelt sich bei dem monomeren Toxin in Lösung um die lytisch aktive Form von HlyA. Es existieren einige Studien dazu, ob es im Verlauf der Bindung oder Porenbildung zur Dimerisierung oder Oligomerisierung des Toxins kommt, wie es für andere PFTs postuliert wurde. Einige Studien deuten auf eine Oligomerisierung der Toxinmoleküle hin (Benz et al., 1989, Ludwig et al., 1993), andere postulieren eine durch ein Monomer gebildete Pore (Bhakdi et al., 1986; Menestrina et al. 1987; Menestrina, 1988). In letzterem Fall wäre HlyA das erste bekannte porenbildende Toxin, das als Monomer lytisch aktiv ist.

1.5.4 Die Modifikation von HlyA: HlyC

HlyC ist ein 20 kDa großes Protein, das als Homodimer aktiv ist. Das Protein überträgt als Lysin-Acyltransferase Fettsäurereste von Acyl-ACP auf die beiden Lysine 564 und 690 des Protoxins Pro-HlyA (Issartel et al., 1991; Ludwig et al., 1996). Diese beiden Lysine unterscheiden sich von anderen Lysinen innerhalb der Aminosäuresequenz dadurch, dass sie unmittelbar hinter einem Glycin liegen. Die beiden aufeinander folgenden Aminosäuren Glycin und Lysin sind hoch konserviert in Toxinen, die durch Acylierung von Lysinen aktiviert werden. Der Austausch des Glycins gegen eine andere Aminosäure führt zu einer fast vollständigen Inaktivierung von HlyA (Pellett & Welch, 1996; Langston et al., 2004); unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um eine Erkennungssequenz für die Acylierung handelt, oder ob es beim Austausch gegen eine andere Aminosäure zu sterischen intramolekularen Behinderungen kommt. Die Acylierung der beiden Lysine erfolgt unabhängig voneinander, d.h. durch die Mutation eines der Lysine wird die Acylierung des anderen Lysins nicht beeinträchtigt (Langston et al., 2004). Die Verhinderung der Acylierung von Lysin 564 durch Aminosäureaustausch führt zu einer verminderten HlyA-Aktivität, jedoch nicht zur vollständigen Inaktivierung; die Acylierung des Lysins 690 ist dagegen essentiell für die lytisch aktive Form des Toxins (Stanley et al., 1994; Pellett & Welch, 1996).

Innerhalb der Aminosäuresequenz von HlyC sind die Aminosäuren an Position 127-129 von großer Bedeutung für die Funktion des Proteins (Guzman-Verri et al., 1997). Der Austausch dieser Aminosäuren führt zu einer starken Reduktion der Aktivität bis hin zur vollständigen Inaktivierung. Vermutlich sind die Aminosäuren an der Erkennung von HlyA beteiligt, und der durch die Mutagenese erzielte Effekt beruht auf der verminderten Affinität des Proteins zu HlyA.

1.5.5 Sekretion von HlyA: HlyB und HlyC

Die Sekretion von HlyA ist Sec-unabhängig und wird durch die Proteine HlyB und HlyC vermittelt (Abb. 1-4). Das Sekretionssystem wird den Typ I-Sekretionssystemen zugeordnet.

HlyB gehört zur Familie der ABC-Transporter (ATP binding cassette transporter), die auch in Eukaryonten vorkommen. HlyB besteht neben zwei hydrophoben Membrandomänen mit jeweils 6 α -helicalen Transmembrandomänen, die einen Membrankanal in der inneren Zellmembran bilden, aus zwei hydrophilen Nukleotidbindedomänen (Zaitseva et al., 2005). Die Transmembrandomänen bilden einen Kanal innerhalb der Membran. Der Exportmechanismus von HlyA über die innere Membran wird dadurch vermittelt, dass die beiden Nukleotidbindedomänen bei Substratbindung dimerisieren und es durch ATP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung kommt (Zaitseva et al., 2005; Hanekop et al., 2006; Randak & Welsh, 2005); diese Konformationsänderung bewirkt wiederum Konformationsänderungen der Membrandomänen, wodurch der Transport von HlyA erfolgt.

HlyD gehört zur Familie der Membranfusionsproteine (membrane fusion protein, MFP) und ist als Trimer aktiv (Thanabalu et al., 1998). Das Protein ist in der inneren Membran der Bakterienzelle verankert, und ein essentieller Faktor bei der Sekretion von HlyA. Studien zeigten, dass HlyD u. a. für die Faltung von HlyA in die finale, aktive Form verantwortlich ist (Pimenta et al., 2005). HlyD ist mit HlyB komplexiert und bildet die Brücke zwischen HlyB, dem Transporter über die innere Membran von *E. coli*, und dem Porin-ähnlichen Transporter TolC, der den Transport durch die äußere Membran vermittelt (Wandersman & Delepelaire, 1990; Thanabalu et al., 1998); das für den Transport essentielle TolC-Trimer wird durch HlyD stabilisiert.

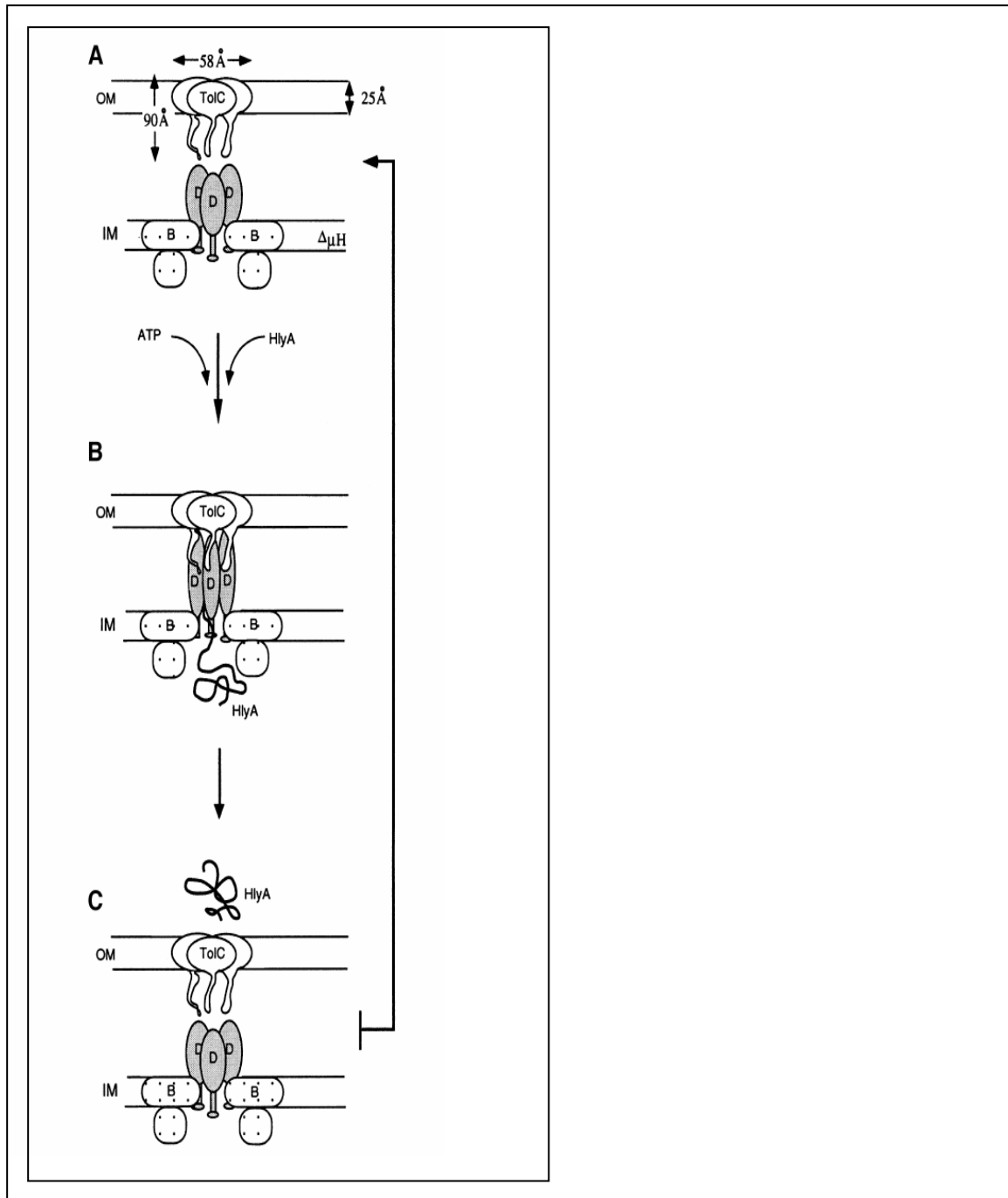


Abb.1-4: Sekretion von HlyA durch HlyB, HlyD und TolC. HlyB hydrolysiert ATP und vermittelt die Translokation von HlyA über die innere Membran (A). Das mit HlyB komplexierte HlyD trimerisiert und bildet die Verbindung zwischen HlyB und TolC. Es stabilisiert TolC (B), welches HlyA über die äußere Membran transportiert (C). IM=innere Membran, OM=äußere Membran

Quelle: Thanabalu et al., 1998

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Struktur des *Escherichia coli* α -Hämolysins (HlyA), welches einen bedeutenden Virulenzfaktor vieler uropathogener *Escherichia coli* Stämme darstellt. HlyA besteht aus der N-terminalen porenbildenden Hälfte und der C-terminalen calciumbindenden Domäne. Die Aminosäuren 272-298 waren als direkt an der Porenstruktur beteiligte amphipathische α -Helix identifiziert worden (Valeva et al., 2008). Es bestanden darüber hinaus Hinweise auf weitere porenbildende Domänen innerhalb der N-terminalen Hälfte des Toxins (Ludwig et al., 1991). Die Arbeit fokussierte sich daher zum Teil auf die Charakterisierung weiterer porenbildender Regionen innerhalb der N-terminalen Hälfte des Proteins. Einen weiteren Ansatz sollten Untersuchungen zur Funktion des N-Terminus im Bereich der Aminosäuresequenz darstellen, über den bis zu diesem Zeitpunkt nur wenig bekannt war.

Weiterhin konzentrierte sich die Arbeit auf Untersuchungen zur Porenbildung durch HlyA. Bis zur Vollendung dieser Arbeit lagen widersprüchliche Aussagen dazu vor, ob das Toxin die Pore durch ein Monomer oder ein Dimer bzw. Oligomer bildet. Die These der monomeren Porenbildung ist von besonderem Interesse, da die Porenbildung aller bisher auf diesen Aspekt hin untersuchten porenbildenden Toxine, die zur Schädigung der eukaryontischen Zellmembran führen, die Oligomerisierung einschließt. HlyA würde somit einen neuen Archetyp porenbildender Toxine repräsentieren, bei denen die Porenbildung durch ein Monomer erfolgt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und andere Materialien

Kaninchenerythrozyten wurden vom Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie bereitgestellt, Humanerythrozyten von freiwilligen Probanden bei Entnahme durch ärztliches Personal des Universitätsklinikums Mainz. Antikörper gegen *E. coli* HlyA und *S. aureus* α -Toxin wurden aufgereinigt und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bhakdi.

<u>Chemikalie/Material</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-rabbit Ig, biotinylated species-specific whole antibody	GE Healthcare, München
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche Applied Science, Mannheim
Bacto™ Agar	Becton & Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Tryptone	Becton & Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton & Dickinson, Heidelberg
Badan (6-bromoacetyl-2-dimethylaminonaphtalene)	Molecular Probes (Invitrogen), Paisley, UK
Biotin-Maleimid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Blutagar (COL-S, BD Columbia 5% SB)	Becton & Dickinson, Heidelberg
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche Applied Science, Mannheim
Calcein (Bis[<i>N,N</i> -bis(carboxymethyl)-aminomethyl]fluorescein)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chromatography Paper 3MM Chr	Whatman, Dassel
Crosslinker DMA, DSS und EGS	Pierce, Erembodegem-Aalst, Belgien
DMEM + GlutaMAX™-I	Gibco (Invitrogen), Paisley, UK
DNA Größenstandard 1kb DNA ladder	New England BioLabs, Ipswich, UK
Einmalküvetten, 1,5 ml (Halbmikro)	MBT Brand, Gießen
Falkonröhrchen	Greiner Bio-One, Solingen
FCS (Fetal Bovine Serine)	Gibco (Invitrogen), Paisley, UK
Fuji Medical X-Ray Film Super RX	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf
HBSS (10x) (Hank's balanced salt without phenol red)	Gibco (Invitrogen), Paisley, UK
HEPES	Gibco (Invitrogen), Paisley, UK
Lipide (3- <i>sn</i> -Phosphatidyl-L-serine, L- α -Phosphatidylcholin, Cholesterol, Sphingomyelin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitrocellulose Transfer Membrane PROTRAN®	Whatman, Dassel
n-Octyl- β -D-glycopyranoside (Octylglucosid)	Alexis, Lörrach
PageRuler™ Prestained Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PenStrep (10000U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Gibco (Invitrogen), Paisley, UK
peqGold Gel Extraction Kit	PEQLab, Erlangen
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
<i>Pfu</i> Ultra™ HF DNA-Polymerase	Stratagene (Agilent), Heidelberg
QIAprep Miniprep Kit / QIAprep Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße	MBT Brand, Gießen
Röntgenentwickler LX24	Kodak, Stuttgart
Röntgenfixierer AL4	Kodak, Stuttgart
Polycarbonatfilter Cyclopore™ Track Etched Membrane	Whatman, Madistone, England

Chemikalie/Material

Restriktionsenzyme
 Sepharose CL-4B
 Shrimps alkalische Phosphatase
 Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex
 T4 DNA Ligase
 Toyopearl HW-55S

 Trypsin-EDTA Solution 10x
 96-Well-Platten

Hersteller

Fermentas, St. Leon-Rot
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Fermentas, St. Leon-Rot
 GE Healthcare, München
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Toyo Soda Mfg. Soda,
 Yamaguci, Japan
 Sigma Aldrich, Taufkirchen
 Greiner Bio-One, Solingen

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Roth aus Karlsruhe bezogen.

2.2 GerätenachweisGerät

Allegra™6KR Centrifuge
 Autoflow CO₂Water Jacketed Incubator
 Biofuge *fresco*
 Brutschrank
 Controlled Environment Incubator Shaker

 Dampfsterilisator
 Elektro-Blottkammer

 Electrophoresis Power Supply Consort EV243/
 Electrophoresis Power Supply EPS1001
 Fluoreszenzimager BioDoc Analyse
 Fluoreszenzphotometer Ultrospec®2000
 Fraction Collector Modell 2110
 Gefrierschrank Hera *freeze* (-70°C)
 Liposomenpresse Avanti®Polar Lipids
 Lumat LB9507

 Magnetrührer IKAMAG®RCT
 Peristaltic Pump P-1

 Power Supply Model 160/1.6
 Säule XK16
 Schüttelinkubator 3032
 Schütteltisch Duromax 2030
 Sorvall®RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge
 Spektrofluorometer FluoroMax™
 Sterilbank Typ ANTAES 48/72
 Test Tube Rotator
 Thermocycler Mastercycler gradient
 Thermomixer compact
 Thermomixer 5437
 Trockensterilisator
 Ultrazentrifuge Optima™LE-80K
 Ultraschallreiniger SONOREX RK 156
 UV-Detektor 2238 UVICORD S II

Hersteller

Beckman Coulter GmbH, Krefeld
 NuAire, Plymouth, MN, USA
 Heraeus, Langenselbold
 Heraeus, Langenselbold
 New Brunswick Scientific, Edison,
 NJ, USA
 Holzner GmbH, Nußloch
 von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
 Amersham Pharmacia Biotech.,
 Wien
 Biometra, Göttingen
 Pharmacia Biotech, Freiburg
 BioRad, München
 Heraeus, Langenselbold
 Avanti®, Alabaster Alabama, USA
 Berthold Technologies, Bad Wildbad
 IKA Labortechnik, Staufen
 Pharmacia Fine Chemicals, Stockholm, Schweden
 BioRad, München
 Pharmacia Biotech, Freiburg
 GFL, Burgwedel
 Heidolph, Schwabach
 Thermo Fisher
 Spex GmbH Berlin
 BioHit Deutschland GmbH, Köln
 Kisker, Steinfurt
 Eppendorf AG, Hamburg
 Eppendorf AG, Hamburg
 Eppendorf AG, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Beckman Coulter GmbH, Krefeld
 Bandelin electro, Berlin
 Labequip, Ontario, Kanada

2.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen die in Tabelle 2-1 dargestellten Bakterienstämme und Zelllinien zum Einsatz. Die *Escherichia coli* Stämme wurden von C. Hughes und V. Kolonakis (Cambridge University, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2-1: Bakterienstämme und Zelllinien

Name	Domäne, Reich	Eigenschaften	Kulturmedium	Referenz
<i>Escherichia coli</i> MC1061	Bacteria, Proteobacteria	Genotyp: araD139Δ(ara-leu)7697, ΔlacX74, gal U, gal K, hsdR, strA	LB-Bouillon, LB-Agar, TY 2x	Casadaban & Cohen, 1980
<i>Escherichia coli</i> MC1061 + pLG575	Bacteria, Proteobacteria	siehe <i>Escherichia coli</i> MC1061, CM-Resistenz	LB-Bouillon, LB-Agar, TY 2x	Stanley et al., 1994
HaCaT-Zellen	Eukarya, Tiere	humane Keratinozyten, adhären	DMEM + GlutaMAX™-1 (Gibco) mit 10 % FCS	CLS Cell Lines Service, Eppelheim

2.4 Stammhaltung und Medien

2.4.1 *Escherichia coli*

Folgende Medien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

LB-Bouillon (Luria-Bertani Bouillon): 10 g Trypton + 5 g Hefeextrakt + 10 g NaCl ad 1l A. dest

LB-Agar: 16 g Agar + 1l LB-Bouillon

TY Medium 2x (Tryptone-Yeast): 16 g Trypton + 10 g Hefeextrakt + 5 g NaCl ad 1l A. dest

Die Stammhaltung und Kultivierung des Bakterienstamms *Escherichia coli* MC1061 erfolgte in LB-Bouillon und auf LB-Agar bei 37°C für 16-24 Stunden (Flüssigkultur unter Schütteln bei 160 rpm). Dem Medium des Stamms *Escherichia coli* MC1061 + pLG 575 wurde Chloramphenicol [33 µg/ml] zur Selektion des Plasmids pLG 575 zugesetzt. Medien für Bakterienstämme nach einer Transformation des Plasmids pYA-Wt bzw. Derivaten dieses Plasmids wurde Ampicillin [100 µg/ml] zugesetzt.

Dauerkulturen wurden angelegt, indem 1 ml Flüssigkultur mit 1 ml Glycerin (100%) versetzt und bei -70°C gelagert wurde.

TY 2x Medium diente der Kultivierung der Bakterien für Toxinreinigungen.

Die zur Selektion verschiedener Stämme eingesetzten Antibiotika lagen in folgenden Stammlösungen vor:

Ampicillin in A. dest [100 mg/ml]

Chloaramphenicol in 96% Ethanol [33 mg/ml]

2) Das Plasmid pyA-WT (Abb. 2-1) basiert auf dem Plasmid pBR322 (Sutcliffe, 1978), und trägt neben einem Resistenzgen gegen Ampicillin (Amp^R), das die Selektion mit Ampicillin ermöglicht, u. a. die Gene *hlyA* und *hlyC* für die HlyA-Synthese und -Modifikation. Das Plasmid wurde als Matrize für PCR-basierte Mutagenese und als Vektor für Klonierungen eingesetzt. Die Klonierung mutierter Fragmente erfolgte nach Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.8.7) von Vektor und Insert mit dem Enzym *Bam*H I. Die Einführung von Cysteinen in die N-terminale Hälfte von HlyA in die bestehende Mutante ΔB (Lys 690 Arg) erfolgte in der Regel durch Klonierung von *Sph*I-Fragmenten.

Zur Kontrolle derivatisierter Plasmide nach der Klonierung und Transformation wurde das Restriktionsenzym *Sca*I eingesetzt, welches das Plasmid in 3 Fragmente spaltet.

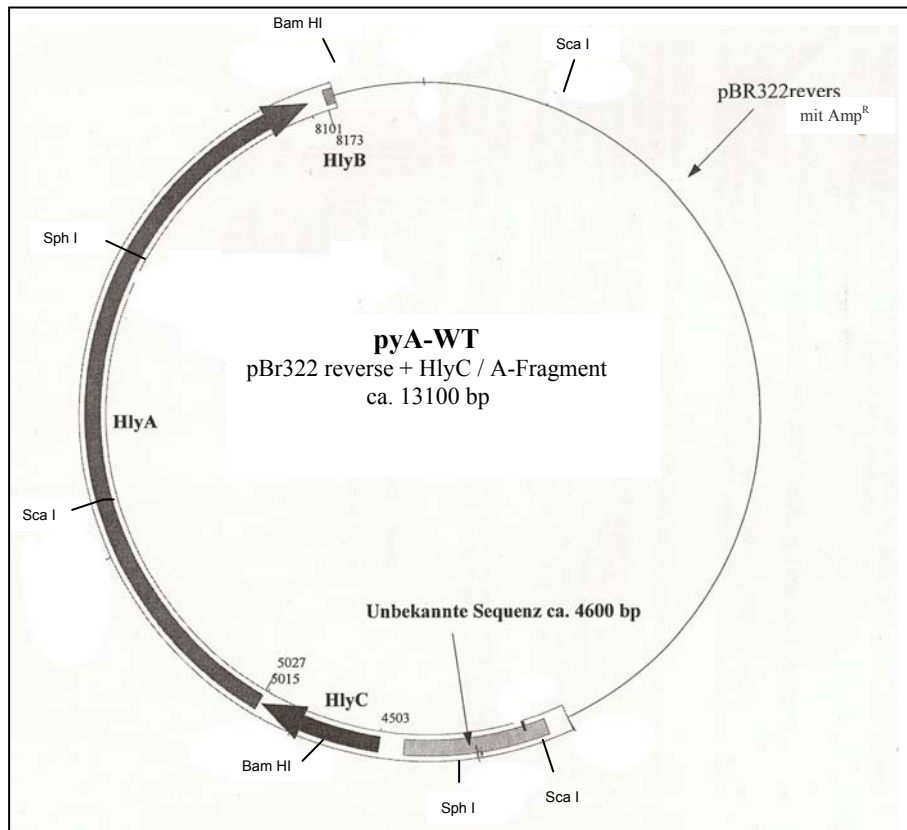


Abb. 2-1: Plasmid pyA-WT

2.6 Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mutanten durch PCR-basierte, zielgerichtete Mutagenese hergestellt und durch die Firma GENterprise (Mainz) sequenziert. Die bei der PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Eine Auflistung der Oligonukleotide findet sich in Tabelle 2-2. Zur besseren Übersicht wurden lediglich zwei Primer (k32c f und k32c r) zur Herstellung eines HlyA-Cysteinderivates

exemplarisch für alle HlyA-Cysteinderivate, und zwei Primer (s352p a355p f) zur Herstellung eines HlyA-Doppelprolinderivates für alle HlyA-Doppelprolinderivate aufgeführt.

Tab.2-2: Zur Amplifikation und Mutagenese eingesetzte Oligonukleotide. Dargestellt sind Name, Nukleotidsequenz, Funktion und Schmelztemperatur. Alle Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/μl vor. AS= Aminosäure, T_M= Schmelztemperatur

Primer	Primersequenz	Aufgabe	Eigenschaften
BamHI_HlyC_F	5'-tgatgttacctcattagttgcagaagac-3'	„äußerer Primer“, Amplifikation von HlyA	T _M = 62,2°C
BamHIpBr322_R	5'-ttcgctactggagccactatcgactac-3'	„äußerer Primer“, Amplifikation von HlyA	T _M = 66,6°C
k32c f	5'-gcaggacaaagcacgtgcgatgcattaaaaaac-3'	Einführung eines Cysteins durch AS-Austausch	T _M = 68,2°C
k32 r	5'-gcttttttaatgcatgcacgtgctttgcctgc-3'	Einführung eines Cysteins durch AS-Austausch	T _M = 68,2°C
s352p a355p f	5'-gacccttacttctgctttccacaagaaac-3'	Einführung zweier Proline durch AS-Austausch	T _M = 66,9°C
s352p a355p r	5'-gaaagcaggaagtaaagggtcaccatcgatccaag-3'	Einführung zweier Proline durch AS-Austausch	T _M = 70,6°C
20-39 f	5'-cactgcagctgcaaagcaatcccaaaccgcaatgcg-3'	Deletion AS 1-40	T _M = 74,9°C
20-39 r	5'-ctgttcccgcattgcgggtttgggattgctttgcaga-3'	Deletion AS 1-40	T _M = 73,8°C
HlyA-D1-50F	5'-ggtaattaatgttacttatccctaaagattataag-3'	Deletion AS 1-50	T _M = 61,7°C
HlyA-D1-50R	5'-gggataagtaacattaattaccttaaccag-3'	Deletion AS 1-50	T _M = 63,3°C
Hlya d1 100f	5'-gaggtaattaatgggcctcaccgaacggggagtg-3'	Deletion AS 1-100	
Hlya d1 100r	5'-cggtgaggcccatttaattaccttaaccagtaatg-3'	Deletion AS 1-100	
n-term ha f	5'-tatccctatgacgtccccgactatgcctgcagctgcaaagcaatcc-3'	Austausch der 12 N-terminalen AS durch das HA-Epitop YPYDVPDYA	T _M =>75°C
n-term ha r	5'-ggcatagtcggggacgtcatagggatacatttaattaccttaaccag-3'	Austausch der 12 N-terminalen AS durch das HA-Epitop YPYDVPDYA	T _M = 74,4°C

2.7 Sterilisationsverfahren und Entsorgung von Bakterienstämmen

Alle verwendeten Gefäße, Zubehör, Lösungen und Nährmedien wurden vor Gebrauch durch 30-minütiges Erhitzen im Dampfsterilisator (121°C) sterilisiert. Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte für vier Stunden bei 180°C im Heißluftsterilisator.

Bakterienstämmen sowie bakteriell kontaminierte Lösungen und Materialien wurden vor ihrer Entsorgung durch 30-minütige Dampfsterilisation bei 134°C behandelt.

2.8 Methoden

2.8.1 Messung intrazellulären ATPs

Das Enzym Luziferase katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung von Luziferin zu Oxiluziferin, in deren Verlauf Energie in Form von Licht abgegeben wird. Die Lichtemission ist proportional zum ATP-Gehalt der Zelle. Die Methode ist somit geeignet, um den ATP-

Verlust der Zelle durch porenbildende Toxine zu untersuchen. Aus der Zelle durch die Poren ausgetretenes ATP wird vor der Messung durch Abnahme des Überstandes vor der Messung entfernt.

Durchführung:

$0,4 \times 10^6$ Zellen / ml Kulturmedium wurden zu je 200 μ l 16-24 h in 96-Well Platten wie beschrieben kultiviert. Nach der Kultivierung wurde das Medium entfernt, 100 μ l vorgewärmtes HBSS mit oder ohne Toxin auf die Zellen gegeben, und 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Messung intrazellulären ATPs wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 100 μ l 1% Triton X-100 lysiert, mit 150 μ l A. dest verdünnt und nach Zugabe von 20 μ l Luziferase (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II) die Lichtemission im Lumat LB9507 gemessen.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly (1979)

Die Plasmidpräparation nach Birnboim & Doly beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse zum Aufschluss von Bakterienzellen, und auf der selektiven Ethanol-Präzipitation von DNA. Die Methode eignet sich besonders zur Kontrolle von Klonen nach Plasmid-Transformationen. Für enzymatische Reaktionen sind die Plasmide nur bedingt geeignet, weil die Plasmid-DNA nicht vollständig von Salzen und genomischer DNA gereinigt werden kann.

Puffer: Lösung I: 50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
Lösung II: 1% SDS (w/v), 0,2 M NaOH
Lösung III: 3 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Durchführung :

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Tischzentrifuge Biofuge *fresco* (Heraeus) bei 13000 rpm und 4°C.

1,5 ml einer über Nacht kultivierten Flüssigkultur wurden durch 3-minütige Zentrifugation abgeerntet und das Bakterienpellet in 100 μ l Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 μ l Lösung II erfolgte die Lyse der Zellen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 200 μ l Lösung III präzipitiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zur Präzipitation der DNA mit 1 ml 96%-igem Ethanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Plasmid-DNA abzentrifugiert (5-10 min) und der Überstand verworfen werden. Das vollständig getrocknete DNA-Pellet wurde in 35 μ l A. dest aufgenommen.

Für enzymatische Reaktionen wurde die Plasmid DNA mit dem QIAprep Miniprep Kit oder dem QIAprep Midiprep Kit von Qiagen nach Angaben der Hersteller isoliert. Diese Isolierung der Plasmid DNA beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen (Birboim und Doly, 1979), und der anschließenden Adsorption der DNA an eine Silikamatrix bei hoher Salzkonzentration. Die Salze werden in einem Waschschrift durch einen speziellen Puffer entfernt, während die Plasmid-DNA gebunden bleibt. Anschließend kann die DNA mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration oder mit sterilem Wasser von der Säulenmatrix eluiert werden.

2.8.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische Fragmente amplifiziert, d.h. es wurden jeweils zwei spezifische Oligonukleotidprimer eingesetzt, die als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienten. Die PCR besteht generell aus drei Reaktionen: (I) Denaturierung von DNA-Doppelsträngen bei 94°C, (II) Anlagerung der Primer und (III) Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die Polymerase bei 72 °C.

Durchführung:

Die in Tabelle 2-3 angegebenen Komponenten der PCR wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert. Die Reaktionen der PCR wurden im Thermocycler durch das zuvor eingestellte PCR-Programm gesteuert. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der *Pfu*-Polymerase. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine Korrekturlese-Funktion (proof reading function), wodurch das PCR-Produkt deutlich weniger Fehler in der Sequenz aufweist.

Tabelle 2-3 : Pipettierschema für PCR-Ansätze.

Komponente	Endkonzentration im Ansatz
10 µl 10x Puffer (<i>Pfu</i> -Polymerase)	1x
1 µl dNTP-Mix [20 mM]	200 µM
1 µl Vorwärts-Primer [100 µM]	0,5 µM
1 µl Rückwärts-Primer [100 µM]	0,5 µM
0,5-1 µl DNA Template	
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase [2,5 U/µl]	2,5 U/100 µl
ad 100 µl A.dest	

PCR-Programm :

- | | | | | |
|----|-----|------|----------------------------|-------|
| 1. | 10' | 95°C | initiale Denaturierung | |
| 2. | 30" | 95°C | Denaturierung | } 30x |
| | 1' | 50°C | Primer-Anlagerung | |
| | 10' | 72°C | Polymerase-Reaktion | |
| 3. | 12" | 72°C | finale Polymerase-Reaktion | |
| 4. | | | Holding Temperature 8°C | |

2.8.4 Zielgerichtete Mutagenese

Durchführung:

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgte durch PCR in zwei Schritten (Abb. 2-2): bei der ersten PCR wurden in zwei verschiedenen Ansätzen zwei DNA-Fragmente amplifiziert, die sich im Bereich der „inneren“ Primer (Primer innerhalb *hlyA*) überlappten; diese Primer wiesen die gewünschte Mutation auf. Als „äußere“ Primer wurden die Primer BamHI_HlyC_F und BamHlpBr322_R (siehe Tab.1) eingesetzt, die außerhalb der *hlyA*-Sequenz und jenseits der beiden BamHI-Restriktionsstellen des Plasmids pYA-WT binden. Sofern im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurde als Matrize der ersten PCR ein Derivat des Plasmids pYA-WT mit der Mutation N234A verwendet. Das codierte Toxin besitzt die uneingeschränkte hämolytische Aktivität von Wildtyp-HlyA, neigt aber weniger zur Bildung von Aggregaten (Dr. Valeva, pers. Mitteilung). In der zweiten PCR dienen die aufgereinigten PCR-Fragmente der ersten PCR als Matrize. Das vollständige Fragment mit der gewünschten Mutation wurde mit Hilfe der „äußeren“ Primer aus der ersten PCR amplifiziert.

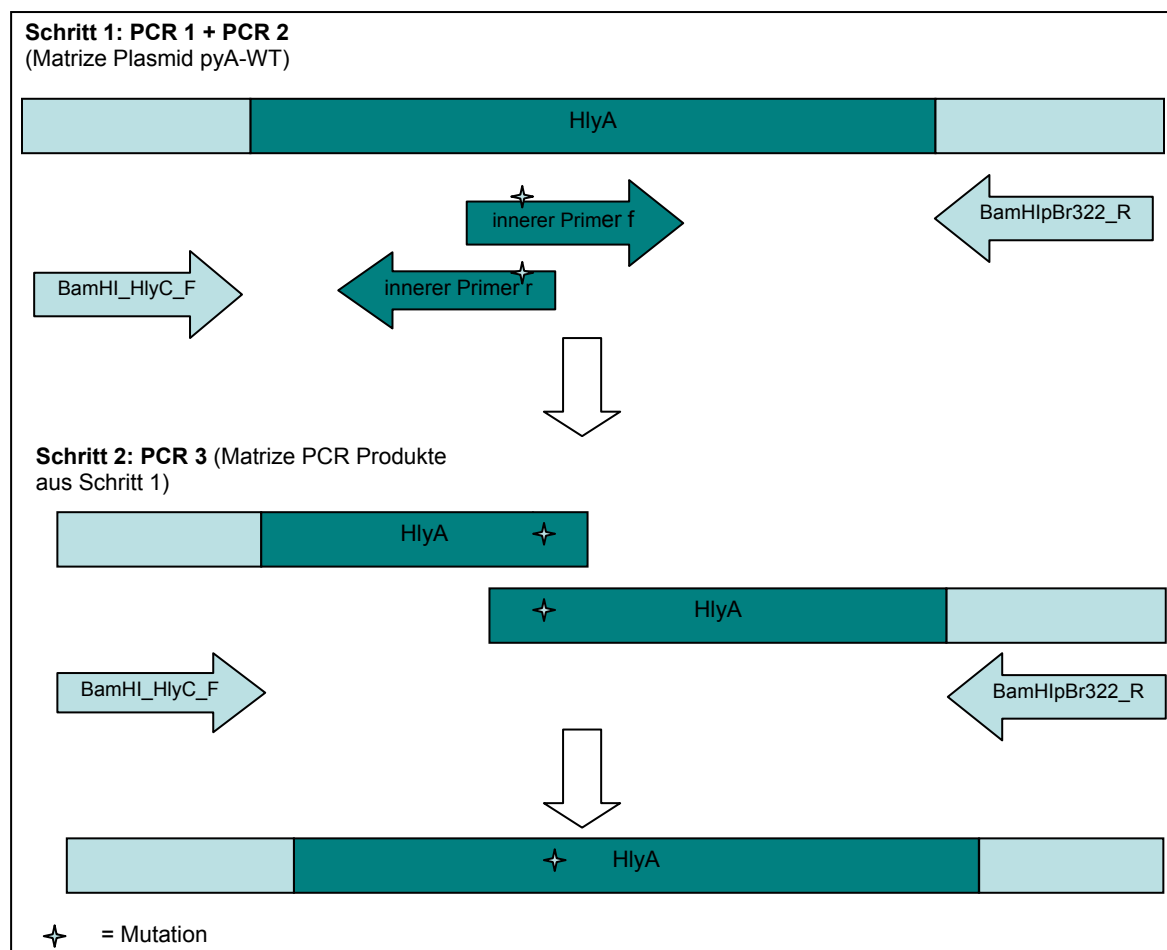


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese.

Toxinmutanten mit zusätzlicher Mutation des Lysins 690 wurden durch Restriktion des modifizierten Plasmids pYA-WT mit dem Restriktionsenzym *SphI* (*PaeI*) und Umklonierung des Inserts in das bereits existierende Plasmid mit der gewünschten Lysin-Mutation (Derivat ΔB) hergestellt.

2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft der DNA, auf Grund ihrer negativen Ladung durch die Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA dabei das Agarose-Gel passiert, ist proportional zur ihrer Größe. Die Porengröße des Gels ist abhängig von der Gelkonzentration: je hochprozentiger das Gel ist, desto kleiner sind die Poren.

Die DNA ist mit Ethidiumbromid detektierbar, das in die DNA interkaliert. Das interkalierte Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, unter UV-Licht zu fluoreszieren.

Puffer und Lösungen:

50 x TAE-Puffer:	121,14 g/l Tris 9,31 g/l Na ₂ EDTA*2 H ₂ O 2,7% Eisessig (v/v)
1 x TAE-Puffer (1 l):	20 ml 50 x TAE-Puffer ad 1 l A.dest
Beschwererlösung:	0,1% Bromphenolblau (w/v) 50% Glycerin (v/v) 50 mM EDTA

Durchführung:

1% Agarose wurde in 30-50 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Das Gel wurde auf etwa 60°C abgekühlt und nach Zugabe von 2 μ l Ethidiumbromidlösung auf den Gelträger gegossen. Die Polymerisation des Gels dauerte 30 Minuten. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit mindestens 25% Beschwererlösung versetzt. Spannung und Stromstärke während der Gelelektrophorese betragen maximal 100 V und 80 mA, um ein Schmelzen der Agarose zu verhindern.

2.8.6 Gelelution mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder peqGold Gel Extraction Kit

Die Methode der Gelelution erlaubt die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.8.5), und die anschließende Elution der gewünschten DNA-Fragmente aus der Agarose. Durch die selektive Bindung der DNA an

das Säulenmaterial Kits wird die DNA von ungewünschten Komponenten gereinigt, und schließlich in Elutionspuffer von der Säule gelöst.

Die Durchführung erfolgte nach Anleitung der Hersteller mit den zu den Kits gehörenden Puffern. Zentrifugiert wurde in der Tischzentrifuge Biofuge *fresco* (Heraeus).

2.8.7 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit der Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen spezifische Palindrome in der DNA-Sequenz, und schneiden die DNA an diesen Stellen. Die Schnittstellen können einander gegenüber angeordnet (glatte Enden, blunt ends) oder aber versetzt sein (kohäsive Enden, sticky ends).

Durchführung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Restriktionsenzyme verwendet, die zu kohäsiven Enden der verdauten DNA führten.

Die Reaktion erfolgte in folgendem Restriktionsansatz:

x µl DNA
0,1 V 10x Puffer des entsprechenden Restriktionsenzym
0,05-0,1 V Restriktionendonuklease
ad 1 V A. dest

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert. Bei der Synthese von Vektor- und Insert-DNA, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, erfolgte der Restriktionsverdau für 3-5 Stunden. Wurde der Verdau zur Plasmidkontrolle durchgeführt, erfolgte er dagegen lediglich für 45 Minuten bis 1,5 Stunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von mindestens 0,1 V Beschwererlösung abgestoppt.

2.8.8 Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase spaltet freie Phosphatgruppen von DNA und Proteinen ab. Diese Eigenschaft wurde zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA genutzt, um eine Rückligation des Vektors zu verhindern, und stattdessen die Insertion und Ligation (s. u.) der Insert-DNA zu fördern.

Durchführung:

Die DNA-Dephosphorylierung erfolgte mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) für 1 h bei 37°C in folgendem Versuchsansatz:

x µl DNA
0,1 V 10x Puffer
0,05-0,1 V SAP
ad 1 V A. dest

Die Reaktion wurde abgestoppt durch 15-minütige Inkubation bei 65°C.

2.8.9 Ligation

Unter einer Ligation versteht man die Verknüpfung zweier DNA-Stränge mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Ketten. Dazu benötigt es eine freie Hydroxyl-Gruppe am 3'-Ende der einen und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen Kette. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym aus dem Phagen T4 kann sowohl glatte als auch kohäsive Enden miteinander verknüpfen.

Durchführung:

Die zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittenen und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigten DNA-Fragmente (Vektor und Insert) wurden in folgendem Ansatz miteinander ligiert:

x µl Insert-DNA
y µl Vektor- DNA
0,1 V 10x Puffer der T4 DNA Ligase
0,1 V T4 DNA Ligase
ad 1 V A.dest

Das Verhältnis von Vektor:Insert betrug ungefähr 3:1. Das Mengenverhältnis der DNA-Fragmente wurde im Agarosegel per Auge abgeschätzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur.

2.8.10 Bestimmung von OD und Proteinkonzentration

Bei der Photometrie wird die Absorption von Molekülen oder Zellen bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen verwendet. Das Wachstum der Zellen wurde anhand der Turbidität bei 600 nm verfolgt. Eine $OD_{600} = 1$ kann bei *Escherichia coli* mit einer Zellzahl von etwa 2×10^9 gleichgesetzt werden.

Weiterhin wurde die Methode genutzt, um die Proteinkonzentration gelöster Proteine mit Hilfe von Bradford-Reagenz (BioRad) zu bestimmen. Bradford-Reagenz bildet mit Proteinen einen blauen Komplex, dessen Absorption bei 595 nm proportional zur Konzentration ist.

Durchführung:

- 1) Die Absorption von 1 ml der Bakterienkultur wurde bei 600 nm in Küvetten (10 x 4 x 45 mm) gegen 1 ml des entsprechenden Kulturmediums gemessen.
- 2) Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde die Absorption von 5 µl Protein in 1 ml 1:5 mit A. dest verdünntem Bradford Reagenz bei 595 nm bestimmt. Als Referenz zur Abschätzung der Proteinkonzentration diente eine Eichreihe aus verschiedenen Konzentrationen des Standardproteins Bovine serum albumin (BSA).

2.8.11 Herstellung kompetenter Zellen

Zur gezielten Transformation genetischen Materials in Bakterienzellen wird die Zellwand perforiert, um die Zellen zur maximalen Aufnahme zu befähigen. Dies gelingt optimal bei einer Bakterienkultur, die sich in der frühen exponentiellen Wachstumsphase befindet, durch Behandlung unter hypotonischen Bedingungen.

Derivate des Plasmids pYA-WT wurden nach Mutagenese und Klonierung zunächst in den leichter transformierbaren Bakterienstamm *E. coli* MC1061 überführt. Nach Überprüfung der so erhaltenen Klone wurde das Plasmid mit der gewünschten Mutation aus den Bakterien präpariert und in den Stamm *E. coli* MC1061 + pLG 575 transformiert, der die Reinigung des modifizierten und sekretierten Toxins erlaubt.

Durchführung:

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 3000 rpm, 4°C und hoch eingestellter Bremse in einer Sorvall Zentrifuge in 50 ml Falconröhrchen.

200 ml LB-Medium in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben wurden mit 2 ml einer über Nacht kultivierten Bakterienkultur angeimpft. Im Fall von *E. coli* MC1061 pLG75 wurde dem Medium zur Selektion Chloramphenicol in einer Konzentration von 33 mg/l zugesetzt, während die Kultivierung von *E. coli* MC1061 ohne Selektionsdruck erfolgte. Die Bakterienkultur wurde unter Schütteln (160 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 kultiviert, und die Bakterien durch 15-minütige Zentrifugation pelletiert. Die Resuspension der Zellpellets erfolgte in insgesamt 40 ml eiskaltem, 0,1 mM CaCl₂. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen wie zuvor abgeerntet, und in 1 ml eiskaltem 0,1 mM CaCl₂ aufgenommen. Die Zellen wurden nach 3-5-stündiger Inkubation auf Eis in 50 µl-Aliquots mit jeweils 25 µl sterilem Glycerin versetzt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.8.12 Transformation kompetenter Zellen

Durchführung:

Die Transformation von *E. coli* MC1061 pLG575 erfolgte im Gegensatz zu der Transformation von *E. coli* MC1061 unter ständigem Chloramphenicol-Selektionsdruck [CM 33 mg/l].

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, und auf Eis mit 1-3 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz 30 Minuten inkubiert. Danach folgten ein 2-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und erneute 2-minütige Inkubation auf Eis. Die transformierten Zellen wurden in 1 ml LB-Medium (mit oder ohne CM) überführt und zur Expression des sich auf dem Plasmid befindenden Resistenzgens Amp^R

eine Stunde unter Schütteln (160 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100-500 µl der Zellsuspension auf LB-Agar mit Ampicillin [100 mg/l] bzw. LB mit Ampicillin und Chloramphenicol ausplattiert, um die Zellen zu selektieren, die das Plasmid aufgenommen hatten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die Kontrolle der Klone auf die Aufnahme des gewünschten Plasmids erfolgte wie beschrieben durch Plasmidpräparation und anschließenden Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Scal.

2.8.13 Reinigung des α -Hämolytins aus *Escherichia coli*

Das α -Hämolytin wird von *E. coli* sekretiert und kann somit aus dem Kulturüberstand gereinigt werden. Die Reinigung durch Gelfiltration erlaubt die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Größe.

Durchführung:

2 x 1 Liter 2x TY-Medium in 2-Liter Erlenmeyerkolben wurden mit je 20 ml über Nacht kultivierter Bakterienkultur angeimpft. Der Selektionsdruck zum Erhalt der Plasmide pyA-WT (bzw. Derivate dieses Plasmids) und pLG 575 erfolgte durch Zugabe von Ampicillin [100 ng/l] und Chloramphenicol [33 ng/l]. Im Fall der Aufreinigung von HlyA-Cysteinderivaten wurden dem Medium zum Schutz der freien SH-Gruppe zusätzlich jeweils 500 µl Natrium-Thioglykolat (0,4 g/ml in A.dest, Endkonzentration 0,2 g/l) zugesetzt. Die Erlenmeyerkolben wurden zur Minimierung der O₂-Versorgung mit Parafilm verschlossen und die Kulturen bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von eins kultiviert. Die Bakterienzellen wurden durch zweimalige Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, Rotor GS3, 9000 rpm, 4°C, mit Bremse) entfernt. Der Kulturüberstand wurde in zwei 2-Liter Erlenmeyerkolben mit 1 M Malonsäure auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt und mit je 260 ml 96%-igem Ethanol (Endkonzentration ca. 20%) versetzt. Die Proteinpräzipitation erfolgte unter Rühren über Nacht bei 4-8°C. Nach der Zentrifugation (Beckmann-Zentrifuge, Rotor GS3, 9000 rpm, 4°C, mit Bremse) wurde der Überstand verworfen. Das sich am Becherrand gesammelte Präzipitat wurde einige Minuten bei Raumtemperatur im umgedrehten Becher getrocknet und in 1 ml 8 M Guanidin, 10 mM Bis-Tris, 10 mM DTT, pH 6,0 aufgenommen. Zur Entfernung unerwünschten, schlecht löslichen Präzipitats wurde das Toxin noch einmal für 10 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde über eine XK16 Säule mit Toyopearl HW-55S Säulenmaterial aufgereinigt und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Detektion der Toxin enthaltenden Fraktionen erfolgte mit einem UV-Detektor (UVICORD S II, Modell 2238). Mit jeweils 50 µl der gesammelten Fraktionen wurden, nach Ethanolpräzipitation zur Entfernung des Guanidins, durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.8.21) in einem 10%-igen SDS-Gel und Coomassie-Färbung (Kapitel 2.8.22) die Reinheit

des Toxins überprüft. Die Fraktionen mit viel Toxin und möglichst geringen Mengen anderer Proteine wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt und die Aktivität im Hämolysetiter überprüft (Kapitel 2.8.14).

2.8.14 Untersuchung der hämolytischen Aktivität im Hämolysetiter

Als Hämolyse wird der Austritt von Hämoglobin aus Erythrozyten verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie zur Untersuchung der porenbildenden Aktivität von α -Hämolysin eingesetzt.

Durchführung: Je nach Toxinkonzentration wurden 1-10 μ l Toxin in 100 μ l HBSS renaturiert und schrittweise 1:1 verdünnt. Anschließend erfolgte eine 1:1 Verdünnung mit Kaninchenerythrozyten, die zuvor im Verhältnis 2,5:100 in HBSS verdünnt worden waren. Diese wurden im nachfolgenden als 2,5 %-ige Erythrozyten beschrieben. Die Erythrozyten wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Hämolyse wurde zur einfachen Überprüfung der Toxinaktivität per Auge abgelesen; die Hämolyse ist erkennbar durch eine durchsichtig rote Farbe im Vergleich zu nicht lysierten Erythrozyten.

Zur genaueren Ermittlung der konzentrationsabhängigen hämolytischen Toxinaktivität wurde die Platte eine Minute bei 1000 rpm (Beckman Zentrifuge) zentrifugiert, und die Absorption des freien Hämoglobins in einer 1:10 Verdünnung bei 414 nm bestimmt; die Absorption ist proportional zur Hämolyse.

2.8.15 Untersuchung der hämolytischen Aktivität auf Blutagar

Blutagar wurde nachträglich mit Ampicillin [100 mg/l] und Chloramphenicol [33 mg/ml] versetzt. *Escherichia coli* MC1061 + pLG575 wurde nach Transformation mit dem Plasmid pYA-WT oder einem Derivat des Plasmids auf dem Agar bei Vereinzeln der Zellen ausgestrichen, und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die hämolytische Aktivität zeigte sich durch einen klaren, kreisförmigen Hof um die vereinzeln Bakterienkolonien herum, der durch die Lyse der Erythrozyten zustandekommt.

2.8.16 Osmo-Protektion (Schutzversuche)

Schutzversuche stellen eine Methode zur Untersuchung der Porengrößen. Moleküle mit definiertem Molekulargewicht und definiertem Radius werden eingesetzt, und verhindern durch osmotische Protektion die Cytolyse / Hämolyse der Zielzelle, sofern sie zu groß sind um die Pore zu passieren. Zum Vergleich der Porengröße von Wildtyp-HlyA und dem deletierten HlyA-Derivat Δ 1-50 wurde in dieser Arbeit der Protektor Polyethylenglykol (PEG) mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet.

Durchführung:

α -Hämolyisin in einer Konzentration von etwa 300 ng/ml wurden mit 1,25%-igen Kaninchenerythrozyten in HBSS unter Zugabe der Protektoren 15 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert, zentrifugiert (1min, 2000 rpm) und die Absorption des 1:10 verdünnten Überstandes bei 412 nm bestimmt. Die eingesetzten Protektoren und ihr molekularer Radius (Scherrer & Gerhardt, 1971) sind in Tabelle 2-3 dargestellt. Die Konzentration wurde so eingestellt, dass er mit dem osmotischen Druck im Innern der Zelle ungefähr identisch war.

Tab. 2-4: Osmoprotektoren

Substanz	Molarität [mM]	Molekularer Radius [nm]
Polyethylenglykol 300	90	~0,58 nm
Polyethylenglykol 400	80	~0,68 nm
Polyethylenglykol 600	60	~0,8 nm

2.8.17 SH-spezifische Markierung von HlyA

Die Aminosäuresequenz von HlyA enthält kein Cystein. Nach Einführung eines Cysteins durch zielgerichtete Mutagenese ist daher die spezifische Markierung mit den Substanzen Badan und Biotin-Maleimid möglich, die an freie SH-Gruppen binden. Die Markierung mit dem Fluorophor Badan, dessen Emission abhängig von der Umgebung ist, erlaubt die fluoreszenzspektrometrische Untersuchung möglicher Protein-Membran-Interaktionen. Die Biotinylierung erlaubt die Detektion des Proteins mit Streptavidin nach einem Westernblot sowie Immunpräzipitation mit Biotin-spezifischem Gelmaterial.

Durchführung:

1,5 ml Toxin in Guanidin mit einer Konzentration von etwa 120 bis 240 μ g/ml wurde 1:10 in 96%-igem Ethanol für mindestens 30 Minuten bei -20°C präzipitiert, 10 Minuten abzentrifugiert, und nach einmaligem Waschen mit eiskaltem 70%-igen Ethanol getrocknet und in 300 μ l 8 M Guanidin, 20 mM Hepes, pH 7,0 aufgenommen. Das Toxin wurde für 1h im Dunkeln mit 1 mM Badan bzw. 1 mM Biotin-Maleimid [20 mM in DMSO] inkubiert und anschließend wie zuvor präzipitiert. Die finale Resuspension erfolgte in 35 μ l 8 M Guanidin, 20 mM HEPES.

Badanmarkiertes Toxin wurde durch SDS-PAGE auf freies Badan überprüft. Dazu wurden zwei bis fünf μ g Toxin auf ein 7,5-prozentiges SDS-Gel aufgetragen, und das Gel nach der Elektrophorese unter UV-Licht fotografiert. Eventuell vorhandenes freies Badan wird durch die Elektrophorese von dem Toxin getrennt und ist als fluoreszierende Bande auf Höhe der Probenpuffer-Lauffront im Gel erkennbar. Toxinproben mit freiem Badan wurden nicht für Versuche verwendet.

2.8.18 Gewinnung von Ghosts aus Kaninchen-Erythrozyten

Die hypotonische Lyse von Erythrozyten erlaubt die Entfernung aller zellulären Komponenten und die Isolierung der Membranen. Durch diese Methode kann man auf Membranen mit natürlicher Lipid- und Proteinzusammensetzung zurückgreifen.

Durchführung:

10-20 ml 3 mal in PBS (siehe Kapitel 2.4.2) gewaschener Kaninchen-Erythrozyten wurden auf Eis in 10 mM HEPES, pH 7,5, hypotonisch lysiert. Die Membranen wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS34, 15 min, 13000rpm, 4°C) pelletiert und so lange mit eiskaltem 10 mM HEPES gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Der finale Waschschritt erfolgte zur stärkeren Aufkonzentrierung in 10 mM HEPES, 125 mM NaCl, pH 7,5. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt, und die Ghosts aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.8.19 Gewinnung von Ghosts aus Human-Erythrozyten

Puffer: 5 mM Phosphatpuffer (5 mM NaH₂PO₄ + 5 mM Na₂HPO₄), pH 8,0

Durchführung:

Die Gewinnung von Ghosts aus Human-Erythrozyten erfolgte im Wesentlichen wie unter Kapitel 2.7.18 beschrieben. Anstelle von HEPES oder HEPES/NaCl wurde jedoch 5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0, verwendet.

2.8.20 Toxin-Membran-Interaktionsstudien mit cysteinsubstituiertem HlyA

Die Messung der Fluoreszenz spezifisch fluoreszierender Substanzen (Fluorophore) erlaubt die Aufnahme von Emissionsspektren und die Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei definierter Anregungswellenlänge. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluoreszenzmessungen mit cysteinsubstituierten, badanmarkierten α -Hämolysin-Derivaten zur Untersuchung von Toxin-Membran-Interaktionen durchgeführt. Das Fluoreszenzspektrum von Badan ist umgebungsabhängig; in hydrophober Umgebung, wie sie auch Membranen darstellen, erfolgt eine Verschiebung des Maximums in den kurzwelligeren Emissionsbereich.

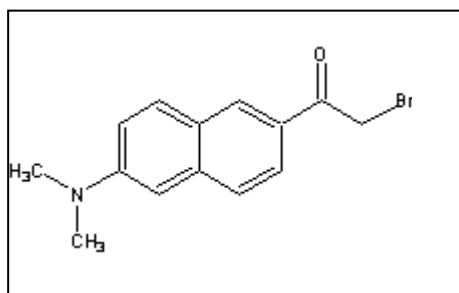


Abb. 2-3: Strukturformel von Badan.

Durchführung:

Badanmarkiertes Toxin wurde in Lösung und nach Interaktion mit Kaninchen-Ghosts fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Toxin in Lösung wurde in einer Endkonzentration von 10 mg/ml in 700 µl HBSS + 20 mM HEPES renaturiert, und die Badan-Fluoreszenz unmittelbar im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Zur Untersuchung der Membraninteraktion wurde Toxin in 700 µl HBSS + 20 mM HEPES [30 mg Toxin/ml] mit 50 µl Kaninchen-Ghosts 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, die Ghosts zweimal durch dreiminütige Zentrifugation und Entfernung des Überstandes gewaschen, und schließlich in 700 µl HBSS + 20 mM HEPES aufgenommen, um dann das Fluoreszenzspektrum aufzunehmen.

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte bei einer Anregung von 365 nm und einer Emission von 400-600 nm im SPEX Fluoromax. Die Fluoreszenz des jeweiligen Ansatzes wurde gemessen, der Ansatz anschließend mit 1% Triton versetzt, und ein weiteres Spektrum aufgenommen. Die Kontrolle (Puffer mit und ohne Ghosts / mit und ohne Triton) wurde während der Aufnahme der Spektren automatisch abgezogen, um ausschließlich das Fluoreszenzspektrum des Badans ohne Eigenfluoreszenz anderer Komponenten zu erhalten. Das Maximum des Spektrums wurde abgelesen.

2.8.21 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Die Bedingungen der SDS-PAGE erlauben die Auftrennung von Proteinen proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und Disulfidbrücken, die an der Tertiärstruktur der Proteine beteiligt sind, durch Mercaptoethanol reduziert. Die SDS-Anionen binden an die Aminosäurereste der Proteine, wodurch ein Komplex mit negativer Nettoladung entsteht, die proportional zu der Größe des Proteins ist. Die natürliche Ladung des Proteins ist dabei vernachlässigbar. Im elektrischen Feld wandert der Anionen-Protein-Komplex zur Anode. Das Gel besteht aus einem gering vernetzten Sammelgel und einem hoch vernetzten Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine bei niedrigem pH (6,8) zu einer schmalen Bande konzentriert. Im Trenngel erfolgt ein pH-Sprung auf pH 8,8, und die Proteine passieren das Gel ihrem Molekulargewicht entsprechend unterschiedlich schnell.

Puffer und Lösungen:

Elektrophoresepuffer:	14,4 g/l Glycin 1% SDS (w/v) 3,03 g/l Tris (w/v)
4 x SDS-Probenpuffer:	10% Glucose (w/v) 10% SDS (w/v) 10 mM Tris 0,05 % Bromphenolblau (w/v)

Tab. 2-5: Pipettierschema für SDS-Gele.

	Sammelgel	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%
A. dest	1,5 ml	2,7 ml	2 ml
Acrylamidlösung	350 µl	1,25 ml	1,67 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	625 µl	-	-
1,5 M Tris, pH 8	-	1,25 ml	1,25 ml
10% APS	12,5 µl	25 µl	25 µl
20% SDS	12,5 µl	25 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Durchführung:

Die Komponenten der Gele wurden in der in Tabelle 2-5 dargestellten Reihenfolge zusammengegeben, und nacheinander Trenngel und Sammelgel im SDS-Gießständer gegossen. Die Polymerisation der Gele erfolgte für jeweils 20 Minuten. Die Protein-Proben wurden mit mindestens 25% 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 3-5 Minuten auf 95 erhitzt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von maximal 150 V. Die Proteine wurden entweder durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht, oder im Westernblot detektiert.

2.8.22 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Der Farbstoff Coomassie-Blau interagiert mit den Aminosäuren der Proteine. Daher kann, nachdem das Polyacrylamidgel gefärbt wurde, zuerst überschüssige Farbe durch Entfärberlösung entfernt werden, bevor es zu einer Entfärbung der Proteine kommt.

Lösungen:

Färbelösung: 15% Ethanol (v/v)
 15% Eisessig (v/v)
 0,05% Coomassie blue R250 (w/v)

Entfärberlösung: 20% Ethanol (v/v)
 10% Eisessig (v/v)

2.8.23 Westernblot und Immundetektion

Beim Western- oder Immunblot werden die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Trägermembran (Nitrocellulose) übertragen. Spannung und Stromstärke werden in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine gewählt. Nach dem Transfer können die Proteine auf der Trägermembran mit Hilfe von Antikörpern detektiert

werden. Diese Methode erlaubt eine spezifische Analyse durch Einsatz spezifischer Antikörper und ist bereits mit geringsten Proteinkonzentrationen durchführbar.

Lösungen und Antikörper:

CAPS-Puffer: 2,2 g/l CAPS
10% Methanol (v/v)
pH 11,0

TBS: 6,05 g/l Tris
8,76 g/l NaCl
pH 7,0

TBS-T: TBS + 0,1 % Tween 20

1. Antikörper: - Anti-HlyA Antikörper 1:10 000 verd.
- Anti- α -Toxin Antikörper 1:2000 verd.
- Rabbit Anti-HA Tag, affinity isolated antibody 1:1000 verd.
2. Antikörper: - Anti-rabbit Ig biotinylated species-specific whole antibody, 1:1000 verd.
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG 1: 4000 verd.
Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex 1:1000 verd.

Durchführung:

Der Westernblot wurde wie folgt aufgebaut: sechs Lagen Chromatography Paper (6x9 cm), Nitrocellulose Transfer Membrane, SDS-Gel, drei Lagen Chromatography Paper. Die Membran wurde vor Gebrauch einige Minuten in Reinstwasser und kurz in Caps-Puffer getränkt, das Chromatography Paper einige Minuten in Caps-Puffer. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte für eine Stunde bei 200 V und maximal 30 mA. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C in TBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert, um die unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteine zu vermeiden. Denselben Effekt erzielt man auch durch Zugabe von 0,5 % Roti Block (RB) zu TBS bzw. TBS-T in den nachfolgend beschriebenen Schritten.

Die Membran wurde dreimal 5 Minuten in TBS + RB gewaschen und 1 h bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in TBS-T + RB folgte die einstündige Inkubation mit dem 2. Antikörper bei Raumtemperatur. Bei Immundetektion mit dem 2. Antikörper Anti-rabbit Ig wurde die Membran nach erneutem Waschen zusätzlich 30 Minuten in Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex inkubiert. Alternativ wurde als 2. Antikörper Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG eingesetzt. Die Membran wurde abschließend viermal 10-15 Minuten in TBS-T gewaschen, und mit BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Filme (Fujifilm) wurden in einer Filmkassette 30 Sekunden bis zu mehreren Minuten auf der Membran belichtet, und anschließend bis zum Erscheinen eines deutlichen Signals in Entwicklerlösung geschwenkt. Die Reaktion wurde durch Überführen des Films in A. dest und kurzes Schwenken in Fixiererlösung abgestoppt.

2.8.24 Coimmunpräzipitation („Pull-down Assay“)

Die Methode der Coimmunpräzipitation erlaubt Untersuchungen der Interaktion zweier Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Untersuchung einer möglichen Oligomerisierung von HlyA auf Ghosts eingesetzt. Dazu wurde ein HlyA-Derivat mit N-terminalem HA-Epitop hergestellt, und ein bereits existierendes HlyA-Derivat (288C) mit Biotin markiert; dies erlaubte den Pull-Down Assay entweder mit EZview™Red Anti-HA Affinity Gel oder mit Immobilized NeutrAvidin™Gel und eine anschließende spezifische Detektion des HA-Derivates mit Rabbit Anti-HA-tag antibody und des biotinylierten Toxins mit Streptavidin. Die Co-Detektion beider Toxinderivate nach einem Pull-down Assay spricht für die Interaktion zweier oder mehrerer Toxinmoleküle.

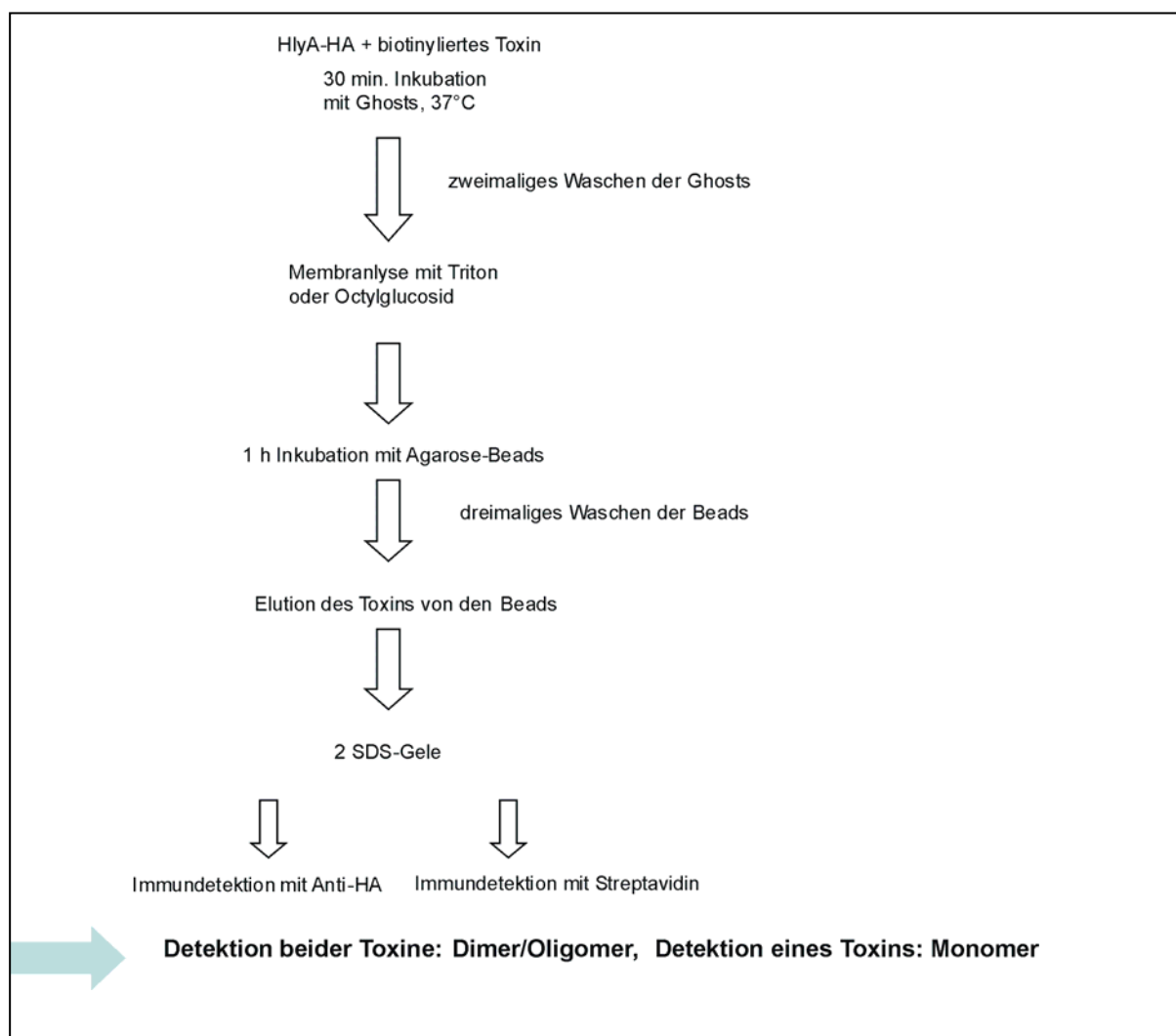


Abb. 2-4: Schematische Darstellung des Prinzips der Coimmunpräzipitation von HlyA.

Durchführung:

Die beiden Toxinmutanten wurden im Verhältnis 1:1,5 bis 1:2 (Überschuss der Mutante, die jeweils nicht spezifisch für die Beads war) gemischt und in 1 ml HBSS + 20 mM HEPES renaturiert. Zur Untersuchung der Interaktion auf Membranen erfolgte die Zugabe von 50 µl

humanen Erythrozytenmembranen (Ghosts) und 15 mM DTT, um die Bildung von Aggregaten in Lösung zu reduzieren; die hämolytische Aktivität mit 15 mM DTT war zuvor im Hämolysetiter überprüft worden. Die Versuchsansätze wurden 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln (600rpm im Thermoblock) inkubiert, und die Ghosts zweimal drei Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert und in Puffer resuspendiert, um ungebundenes Toxin zu entfernen. Die Membranen wurden in 1% Triton bzw. 2% Octylglucosid in HBSS + 20 mM HEPES lysiert, abzentrifugiert und die Ghosttrümmer verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl mit HBSS + 20 mM Hepes äquilibrierten Beads und einstündige Inkubation im Rotator bei 4-8°C. Die Beads wurden 30 Sekunden bei 9000 rpm zentrifugiert um ungebundenes Toxin zu entfernen, in 1 ml HBSS aufgenommen, erneut 5 Minuten wie zuvor inkubiert, und noch zweimal gewaschen. Die Beads wurden mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine von den Beads zu lösen. Anschließend wurden die Beads kurz abzentrifugiert, der Überstand geteilt und auf zwei 7,5%-ige SDS-Gele aufgetragen. Die Proteine wurden im Westernblot detektiert. Eine Membran wurde mit Rabbit Anti-HA-tag antibody und Peroxidase-conjugated AffiniiiPure Goat Anti-Rabbit IgG, die andere mit Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex entwickelt.

2.8.25 Herstellung künstlicher Liposomen

Die Lipide Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin wurden zu je 25% gemischt und in einen Rundkolben mit 2 ml Methanol:Chloroform (1:2) gegeben. Die Lipide wurden unter Schwenken mit einem leichten Stickstoff-Luftstrom getrocknet, in 2 ml Trichlormethan/Chloroform aufgenommen und erneut getrocknet. Dieser Schritt wurde nach Bedarf mehrmals wiederholt, bis sich die Lipide als gleichmäßiger Film an der Glaswand abgesetzt hatten. Zur vollständigen Entfernung der Lösungsmittel wurden die Lipide mindestens 30 Minuten unter Vakuum getrocknet und anschließend im Ultraschallbad in HBSS + 20 mM HEPES gelöst (Endkonzentration 5 mg Lipid/ml); die so behandelten Lipide können mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden, bevor sie zu Liposomen gepresst werden. Das Pressen erfolgte unmittelbar vor dem Einsatz der Liposomen mit einer Liposomenpresse durch einen 0,1 µm Polycarbonatfilter.

2.8.26 Vernetzen von Toxinen auf Liposomen durch Einsatz von Crosslinkern

500-1000 µl Liposomen mit DTT [15 mM] wurden mit Toxin [10-16 µg/ml] 30 Minuten im Thermoblock (37°C, 600 rpm) inkubiert. Die Liposomen wurden mit 60% Saccharose versetzt und in Zentrifugenröhrchen mit jeweils einem Milliliter 30% Saccharose, 15% Saccharose und HBSS überschichtet. Nach einstündigem Flotieren (Ultrazentrifuge, 45000 rpm, 4°C, Beschleunigen und Bremsen *slow*) wurden die im oberen Bereich

abgesetzten Liposomen (ca. 400-500 μ l) abgenommen. Die Methode des Flotierens erlaubt die Abtrennung ungebundenen Toxins von dem mit Liposomen interagierenden Toxin. Die Liposomen wurden mit den vorgelegten Crosslinkern DMA (0,5 mM), DSS (0,2 mM) und EGS (0,2 mM) entweder 30 Minuten bei Raumtemperatur oder zwei Stunden auf Eis inkubiert; die Crosslinker reagieren mit Aminogruppen und sind membranpermeabel, d. h. es wird auch die Verknüpfung membranständiger Peptide ermöglicht. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 100 mM Tris (Stammlösung 1M in A. dest, pH 8,0) und 15-minütige Inkubation. Der Ansatz wurde anschließend mit 25% 4x SDS-Probenpuffer mit DTT [15 mM] versetzt und 3 Minuten bei 95°C gekocht. Die weitere Analyse erfolgte durch SDS-PAGE im 7,5%-igen Gel, Westernblot und Immundetektion mit den Antikörpern Anti-HlyA bzw. Anti- α -Toxin.

2.8.27 Herstellung calceingefüllter Liposomen

Die Herstellung calceingefüllter Liposomen erfolgte im Wesentlichen wie unter Kapitel 2.7.25 beschrieben. Als einziger Unterschied wurden die Lipide vor dem Pressen mit 50 mM Calcein (Stammlösung 200mM) gemischt. Nach dem Pressen wurden die Liposomen zur Abtrennung freien Calceins über eine 10 ml Sepharose CL-4B Säule gereinigt und in 500 μ l Fraktionen mit HBSS, 20 mM HEPES eluiert. Große Moleküle wie Lipide passieren die Säule auf direktem Weg, und werden somit schneller eluiert als kleine Moleküle wie das freie Calcein. Die Fraktionen mit den calceingefüllten Liposomen konnten unter UV-Licht durch ihre leichte Fluoreszenz erkannt werden. Die Liposomen wurden unmittelbar vor dem Versuch präpariert.

2.8.28 Calceinfreisetzung aus Liposomen

Calcein fluoresziert bei der Anregung mit einer definierten Wellenlänge. Bei einer hohen Konzentration der Calceinmoleküle, wie sie in calceingefüllten Lipiden vorliegt, wird die Emission gequencht. Bei einer Porenbildung in den calceingefüllten Lipiden tritt Calcein aus den Lipiden aus. Bei der Freisetzung kommt es zur Verringerung der Calceinkonzentration, und die messbare Fluoreszenzintensität nimmt zu.

Durchführung:

50 μ l calceingefüllte Liposomen wurden mit Toxin [16 μ g/ml] versetzt und 30 Minuten im Thermoblock (37°C, 600 rpm) inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Toxin. Die Liposomen wurden auf 700 μ l mit HBSS verdünnt und die Fluoreszenz im Flurimeter bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 538 nm gemessen. Zur Messung der 100%-igen Calceinfreisetzung wurde die Probe anschließend mit 1% Triton versetzt und die Fluoreszenz erneut gemessen. Die prozentuale Calceinfreisetzung durch das Toxin wurde

anhand der Kontrolle ohne Toxin (0%) und der Fluoreszenz nach Zugabe des Tritons (100%) errechnet.

2.8.29 Bindungsstudien von HlyA an Erythrozytenmembranen

Durchführung:

20 µg Toxin wurden in einem ml HBSS + 20 mM HEPES renaturiert. Das Toxin wurde eine Stunde mit 50 µl Erythrozytenmembranen (Ghosts) bei 37°C unter Schütteln (600 rpm) inkubiert, und anschließend zweimal durch Zentrifugation (3 min, 13000 rpm) und Aufnahme des Ghostpellets in 1 ml HBSS + 20 mM HEPES gewaschen, um nicht gebundenes Toxin zu entfernen. Das Ghostpellet wurde nach dem letzten Waschschrift in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE im 7,5%-igen Trenngel und Westernblot analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Porenbildung durch α -Hämolysin

Bis zum Abschluss dieser Arbeit lagen unterschiedliche Aussagen dazu vor, ob das *Escherichia coli* α -Hämolysin (HlyA) im Verlauf der Porenbildung oligomerisiert (Benz et al., 1989, Ludwig et al., 1993), wie es bereits für viele porenbildende Toxine nachgewiesen werden konnte, oder die Pore durch ein Monomer gebildet wird (Bhakdi et al., 1986, Menestrina et al. 1987, Menestrina, 1988). Der Mechanismus der Porenbildung wurde daher mit drei etablierten Methoden untersucht, die zur Klärung dieser Fragestellung beitragen sollten: Nachweis einer möglichen Oligomerisierung durch Mischen von lytischen und nicht-lytischen HlyA-Derivaten und anschließender Untersuchung der hämolytischen Aktivität, Coimmunpräzipitation und Einsatz von Crosslinkern.

3.1.1 Untersuchung der möglichen Oligomerisierung von HlyA durch Mischen unterschiedlicher HlyA-Derivate

Bei der Oligomerisierung porenbildender Toxine kommt es, wenn zwei unterschiedliche Derivate des entsprechenden Toxins miteinander gemischt werden, in der Regel zur Bildung von Heterooligomeren, die aus beiden Derivaten bestehen. Beim gemeinsamen Einsatz einer hämolytisch aktiven und einer nicht-lytischen Form des Toxins wird eine Veränderung der hämolytischen Aktivität des lytischen Toxins erwartet, wenn das Oligomer auch Moleküle des nicht-lytischen Toxinderivates enthält (Valeva et al., 1997_a, Lee et al., 2005): in einem geringen molaren Verhältnis des nicht-lytischen Toxinderivates zum lytischen Toxin wird die Mutation des nicht-lytischen Derivates in der Regel kompensiert, und die lytische Gesamtaktivität bei gleich bleibender Konzentration des aktiven Toxins wird gesteigert. Bei einem Überschuss an nicht-lytischem Toxin bestehen die Oligomere hauptsächlich aus den inaktiven Toxinmolekülen, und es kommt zu einer Verminderung der hämolytischen Aktivität. In diesem Versuch wurden das lytische HlyA-Derivat HlyA-S288C und die beiden nicht-lytischen Derivate HlyA- Δ B und HlyA-G284P/I287P/S288C eingesetzt. HlyA-S288C besitzt die uneingeschränkte Aktivität von Wildtyp-Toxin (Schindel et al., 2001). HlyA- Δ B ist nicht-lytisch durch Verhinderung der essentiellen Fettsäureacylierung an Lysin 690, wobei aber die Bindung an die Zielzelle nicht beeinträchtigt wird (Stanley et al., 1998). Bei HlyA-G284P/I287P/S288C wurde die porenbildende α -helicale Struktur im Bereich 272-298 durch Einführung der beiden Proline verändert, und dadurch die Bildung der funktionellen Pore verhindert (Valeva et al., 2008).

Im ersten Versuch wurde die hämolytische Aktivität einer konstanten Menge aktiven Toxins HlyA-S288C [40ng/ml] mit steigenden Mengen des nicht-lytischen Toxinderivates HlyA- Δ B bestimmt. Die Toxine wurden im denaturierten Zustand miteinander gemischt, gemeinsam renaturiert, und die hämolytische Aktivität auf Kaninchenerythrozyten bestimmt. HlyA-S288C

wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 mit HlyA- Δ B gemischt. Als Kontrolle der 100%-igen Lyse wurde ein Überschuss aktiven Toxins [10 μ g/ml] eingesetzt. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abb. 3-1 dargestellt. HlyA-S288C in einer Konzentration von 40 ng/ml führte zu einer 49,3%-igen Hämolyse. Die gleiche Konzentration des Toxins S288C mit steigenden Mengen Δ B wies eine prozentuale Hämolyse von 49,2 – 52,4 % auf, d.h. die Aktivität wurde durch das nicht-lytische Toxin nicht beeinflusst. Die Kontrollen mit entsprechend steigenden Konzentrationen (80-8000 ng/ml) des lytischen Toxins S288C führten dagegen wie erwartet zur Steigerung der Hämolyse.

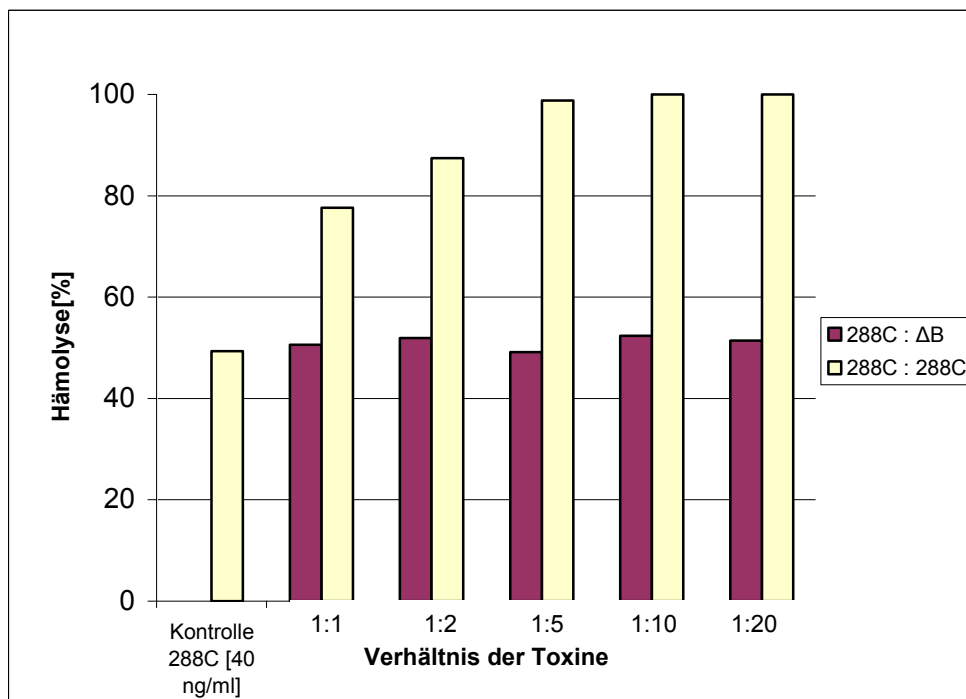


Abb. 3-1: Die prozentuale Hämolyse einer konstanten Menge des aktiven Toxins HlyA-S288C gemischt mit steigenden Mengen des nicht-lytischen Toxins HlyA- Δ B. Das durch Mutagenese monoacylierte, nicht lytische Toxin hat keinen Einfluss auf die Aktivität des aktiven Hämolytins. Bei einer entsprechenden Steigerung der Menge aktiven Toxins wird dagegen bereits bei Zugabe der fünffachen Menge eine etwa 100%-ige Hämolyse erreicht. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man bei festem Verhältnis von lytischem und nicht-lytischem HlyA die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität bestimmt. Dieser Versuch sollte sicherstellen, dass es bei der im ersten Versuch gewählten Toxinkonzentration nicht zu verfälschenden Artefakten kommt. Zusätzlich zu dem nicht-lytischen Toxinderivat HlyA- Δ B wurde hier auch das nicht-lytische Derivat HlyA-G284P/I287P/S288C eingesetzt, dessen Mutation eine andere funktionelle Domäne betrifft; dieses zweite Toxinderivat sollte zeigen, dass es sich bei dem Ergebnis aus dem ersten Versuchsteil um eine allgemeingültige Aussage handelt, die unabhängig von der Art der Mutation ist, die zur lytischen Inaktivität des Toxins führt.

Das lytische Toxin HlyA-S288C wurde im molaren Verhältnis 1:2 (nicht dargestellt) und 1:20 (Abb. 3-2) mit den nicht-lytischen Toxinen HlyA- Δ B und HlyA-G284P/I287P/S288C gemischt.

Die Toxine wurden schrittweise 1:1 verdünnt, und die hämolytische Aktivität bestimmt. Wie Kurven der hämolytischen Aktivität in Abb. 3-2 zeigen, wurde die Aktivität des lytischen Toxins durch keines der beiden nicht-lytischen HlyA-Derivate verändert. Als Positivkontrolle wurde HlyA-S288C mit dem lytischen Toxinderivat HlyA-384C (diese Arbeit) gemischt. In diesem Ansatz war eine gesteigerte Aktivität durch den höheren Verlauf der Kurve klar erkennbar. Die Aktivität von HlyA-S288C fiel erst ab einer Toxinkonzentration von < 5,5 ng/ml unter einen Wert von 50% Hämolyse, im Vergleich zu >80 ng/ml ohne 384C. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht-lytisches *Escherichia coli* α -Hämolsin keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität lytischen Toxins hat. Dieses Ergebnis spricht gegen die Bildung von Heterooligomeren.

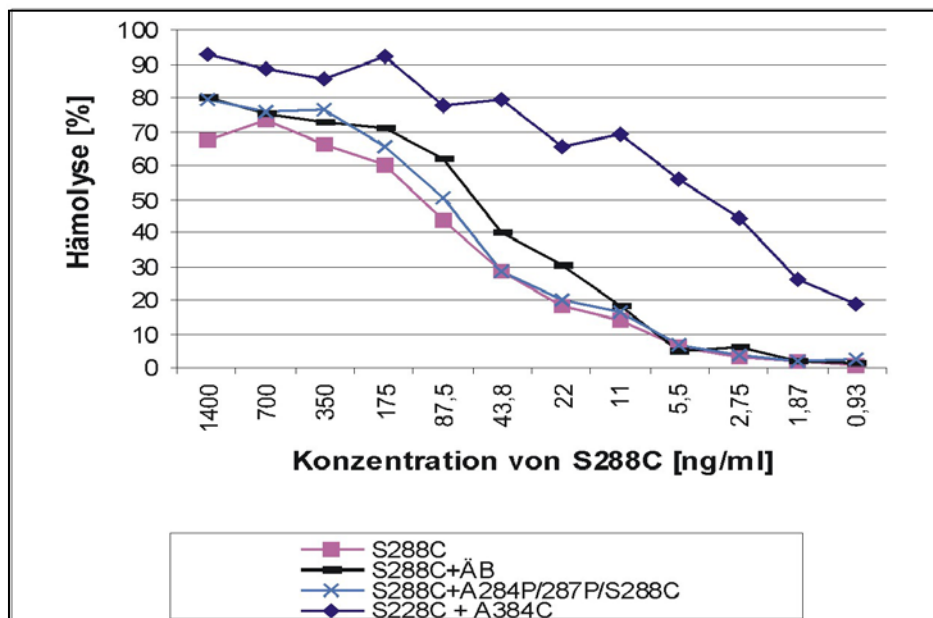


Abb. 3-2: Der Einfluss der beiden nicht-lytischen Toxinmutanten HlyA- Δ B und HlyA-284P/287P auf die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität von HlyA-S288C. Die inaktiven Toxinmutanten wurden dem aktiven Toxin in einem Verhältnis von 1:20 zugesetzt. Keines der nicht-lytischen Toxinderivate beeinflusste die hämolytische Aktivität des Wildtyps. Als Positivkontrolle ist die deutlich gesteigerte Aktivität von HlyA-S288C durch Zugabe eines aktiven Toxinderivates (384C) dargestellt. Das dargestellte Ergebnis resultiert aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Versuche.

3.1.2 Coimmunpräzipitation (Pull-down Assay)

Bhakdi et al. (1986) postulierten die monomere Porenbildung durch die Detektion ausschließlich monomeren Toxins im Westernblot nach Interaktion des Toxins mit Membranen. Bei diesem experimentellen Ansatz kann jedoch eine SDS-Instabilität möglicher Oligomere nicht ausgeschlossen werden. Eine alternative Methode zur Untersuchung einer möglichen Oligomerisierung stellt die Coimmunpräzipitation dar, die Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen unabhängig von einer möglichen Dissoziation durch SDS im Verlauf der SDS-Gelelektrophorese erlaubt. Dazu werden zwei spezifisch nachweisbare

Toxinderivate gemischt, und im Pull-down Assay mit Hilfe von Affinitätsgel (Agarose-Beads) immunpräzipitiert, an die lediglich eines der Derivate spezifisch bindet. Die Detektion beider Proteine nach dem Pull-down Assay spricht für eine Interaktion von zwei oder mehr Protein. Für diesen Versuch wurde durch zielgerichtete Mutagenese ein Toxinderivat konstruiert, bei dem die N-terminalen 12 Aminosäuren durch ein HA-Epitop ersetzt wurden. Als Bindungspartner wurde das Cystein-spezifisch mit Biotin-Maleimid markierte Toxin HlyA-S288C verwendet, das mit Immobilized NeutrAvidin™Gel präzipitierbar ist. Die porenbildende Aktivität beider Proteine wurde vor Versuchsbeginn im Hämolysetiter überprüft. Beide Toxine wiesen dabei die gleiche Aktivität wie Wildtyp-Toxin auf (nicht dargestellt). Die Toxine wurden im Verhältnis 1:1,5 zugunsten des nicht zu präzipitierenden Toxins gemischt, mit Human-Ghosts (Erythrozytenmembranen) inkubiert, und nach Lyse der Ghosts mit EZview™Red Anti-HA Affinity Gel oder Immobilized NeutrAvidin™Gel präzipitiert. Die Lyse der Ghosts erfolgte mit zwei verschiedenen nicht-ionischen Detergenzien, Triton X-100 und Octylglucosid; dieser doppelte Versuchsansatz wurde gewählt, um einen möglichen Zerfall von Oligomeren durch ein bestimmtes Detergenz weitestgehend ausschließen zu können. Die Ergebnisse der beiden Ansätze mit unterschiedlichen Detergenzien wichen nicht voneinander ab, und wurden daher nicht differenziert aufgeführt. Als Kontrolle der Toxinbindung an die Ghosts diente ein Ansatz mit beiden Toxinen, bei dem kein Pull-down Assay durchgeführt wurde. Die Spezifität der eingesetzten Beads wurde durch zwei jeweils nur eines der beiden Toxine enthaltende Ansätze nachgewiesen. Ein weiterer Ansatz ohne Ghosts diente der Überprüfung einer möglichen Oligomerisierung von α -Hämolysin in Lösung. Die Ansätze wurden im Westernblot getrennt immundetektiert: einer Membran wurde mit Rabbit Anti-HA Tag das Derivat HlyA-HA immundetektiert, auf einer zweiten Membran mit Streptavidin das biotinylierte Toxin. In allen Fällen war nach einem Pull-down Assay jeweils nur das HlyA-Derivat detektierbar, das für die eingesetzten Agarosebeads spezifisch war (Abb. 3-3 und 3-4). Ohne Pull-down Assay konnten beide Mutanten detektiert werden, und bestätigten somit die korrekte Bindung an die Ghosts.

In einigen Versuchsansätzen (siehe Abb. 3-4) wurde zusätzlich Toxin in Lösung coimmunpräzipitiert. Da der Puffer in diesem Fall kein DTT enthielt kam es hier zeitweise, jedoch nicht immer, zur Bildung gemischter Dimere, ebenso wie auf Ghosts ohne DTT (nicht dargestellt). Durch 15 mM DTT konnten diese Dimere vollständig verhindert werden, ohne dass die hämolytische Aktivität des α -Hämolysins signifikant beeinträchtigt wurde (nicht dargestellt). Diese Codetektion beider Toxine in Abwesenheit von DTT wurde auf die Bildung von Aggregaten zurückgeführt.

Das Ergebnis der Coimmunpräzipitation spricht gegen eine Dimerisierung/Oligomerisierung von α -Hämolysin während der Interaktion mit Erythrozytenmembranen, und für die Bildung der Pore durch ein Monomer.

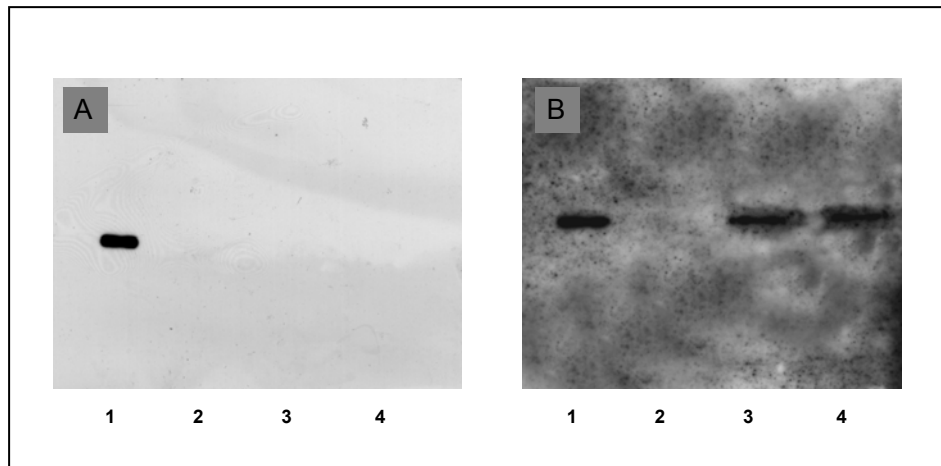


Abb. 3-3 : Coimmunpräzipitation von HlyA-HA und biotinyliertem HlyA mit EZview™Red Anti-HA Affinity Gel. Ein Westernblot wurde mit Streptavidin entwickelt um die biotinylierte Mutante zu detektieren(A), der zweite mit Rabbit Anti-HA-tag antibody (B). Bei der Kontrolle ohne Pull-Down Assay wurden beide Toxine immundetektiert (Spur 1). Nach dem Pull-Down Assay war das biotinylierte nicht detektierbar (Spur2), HlyA-HA mit N-terminalem HA-Tag konnte dagegen detektiert werden (Spur 3). Der Ansatz mit beiden Toxinen wies ausschließlich HlyA-HA auf (Spur 4).

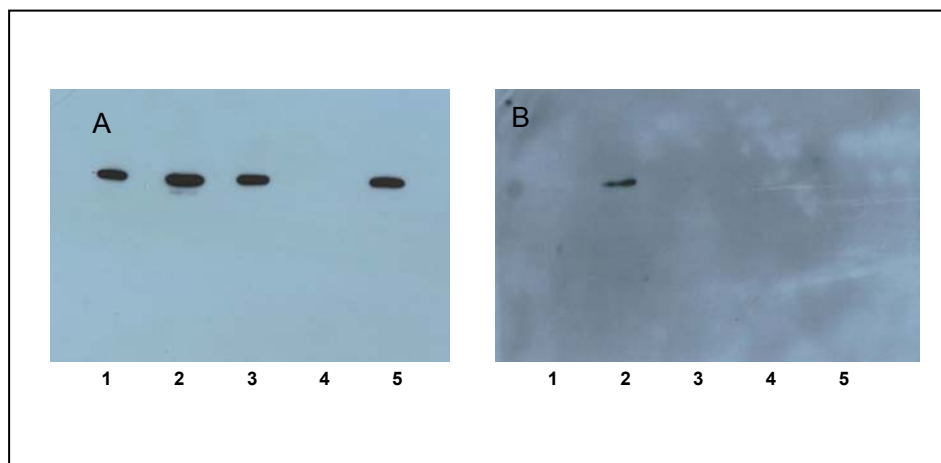


Abb. 3-4: Coimmunpräzipitation mit Immobilized NeutrAvidin™Gel. Ein Westernblot wurde mit Streptavidin entwickelt, um das biotinylierte Toxin zu detektieren(A), der zweite mit Rabbit Anti-HA-tag antibody (B). In Lösung war nach einem Pull-down Assay lediglich biotinyliertes HlyA nachweisbar (Spur 1). Bei der Kontrolle ohne Pull-down Assay auf Ghosts wurden beide Toxine immundetektiert (Spur 2). Nach dem Pull-down Assay auf Ghosts wurde das biotinylierte Toxin detektiert (Spur3), HlyA-HA dagegen nicht (Spur 4). Der Ansatz mit beiden Toxinen wies ausschließlich biotinyliertes Toxin auf (Spur 5).

3.1.3 Einsatz von Crosslinkern

Die Porenbildung von α -Hämolysin wurde weiterhin durch den Einsatz von Crosslinkern untersucht. Durch die Verwendung von Crosslinkern können interagierende Proteine kovalent miteinander verknüpft werden, was die Analyse der Proteine im „Ist-Zustand“ während der Interaktion mit Membranen ermöglicht. Im Fall einer Dimerisierung oder Oligomerisierung im Verlauf des porenbildenden Prozesses werden im SDS-Gel Oligomere mit entsprechendem Molekulargewicht erwartet, die SDS-stabil sind, und nicht durch Kochen der Proben zum Monomer dissoziieren. Die Methode erlaubt die Analyse des Proteins in

Bezug auf eine mögliche Oligomerisierung, ohne dass es zum Einsatz möglicherweise störender Faktoren wie Detergenzien kommt. Als Positivkontrolle für den Versuchsablauf und die Funktionalität der Crosslinker diente *Staphylococcus aureus* α -Toxin, das als Heptamer Poren bildet (Gouaux et al., 1994, Valeva et al., 1997_a). Der Versuch wurde auf künstlichen Liposomen [5mg Lipid/ml] durchgeführt, um ein unspezifisches Vernetzen des Toxins mit Membranproteinen zu vermeiden. Ungebundenes Toxin wurde durch Flotieren in einem Saccharose-Dichte-Gradienten von den Liposomen entfernt. Das mit der Liposomenmembran interagierende Toxin wurde mit den Crosslinkern DMA (Dimethyl adipimidate · HCl, 8,6 Å), DSS (Disuccinimidyl suberate, 11,4 Å) und EGS (Ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate), 16,1 Å) inkubiert, die sich in der Länge ihrer Spacer unterscheiden (Abb. 3-5). Alle drei Crosslinker sind membranpermeabel, d.h. die Reaktion wird sowohl außerhalb als auch innerhalb der Membran ermöglicht.

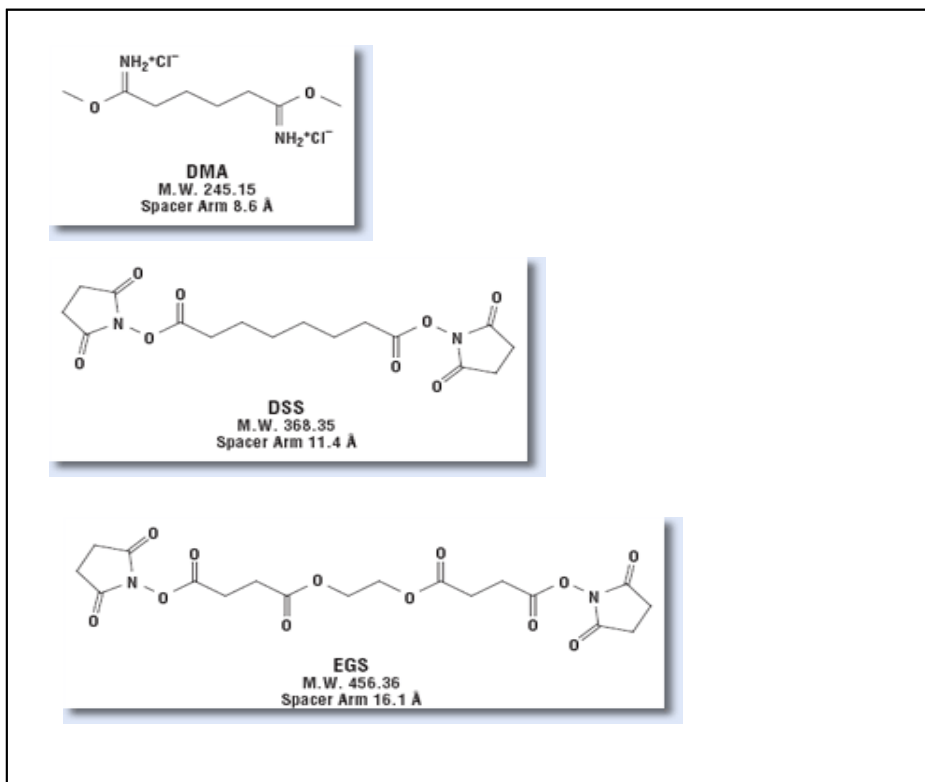


Abb. 3-5: Strukturformeln der in der Arbeit verwendeten Crosslinker DMA, DSS und EGS. Quelle: Perbio Science

Die Toxine HlyA und *S. aureus* α -Toxin wurden nach der Inkubation mit den verschiedenen Crosslinkern mittels SDS-PAGE, Westernblot und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern analysiert. Bei dem *Escherichia coli* α -Hämolysin (HlyA) wurde ungekocht, gekocht und mit den Crosslinkern ausschließlich das Monomer mit einem Molekulargewicht von 107 kDa nachgewiesen (Abb. 3-6). Trotz Einsatz von Crosslinkern unterschiedlicher Länge der Spacer wurde das Toxin in keinem Ansatz zu Molekülen höheren

Molekulargewichts vernetzt. Die Crosslinker wurden in Konzentrationen von 0,2 mM (DSS, EGS) und 0,5 mM (DMA) eingesetzt, die im Bereich der vom Hersteller empfohlenen Mengen liegen. *S. aureus* α -Toxin wies ungekocht eine etwa 240 kDa Proteinbande auf, die auf die Bildung der heptameren Pore hinweist (Abb. 3-6). Durch Kochen der Probe dissoziierten die Oligomere ohne Crosslinker, hier war nur noch das Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa nachweisbar. Die drei Proben mit den Crosslinkern DMA, DSS und EGS wiesen wie erwartet Banden verschiedenen Molekulargewichts auf, je nach Anzahl der durch die Crosslinker verknüpften Moleküle aus dem Oligomer. Das Ergebnis des Versuchs mit Crosslinkern weist darauf hin, dass, anders als bei *S. aureus* α -Toxin, keine Interaktion mehrerer α -Hämolyisin-Moleküle während der Interaktion mit Lipidmembranen stattfindet.

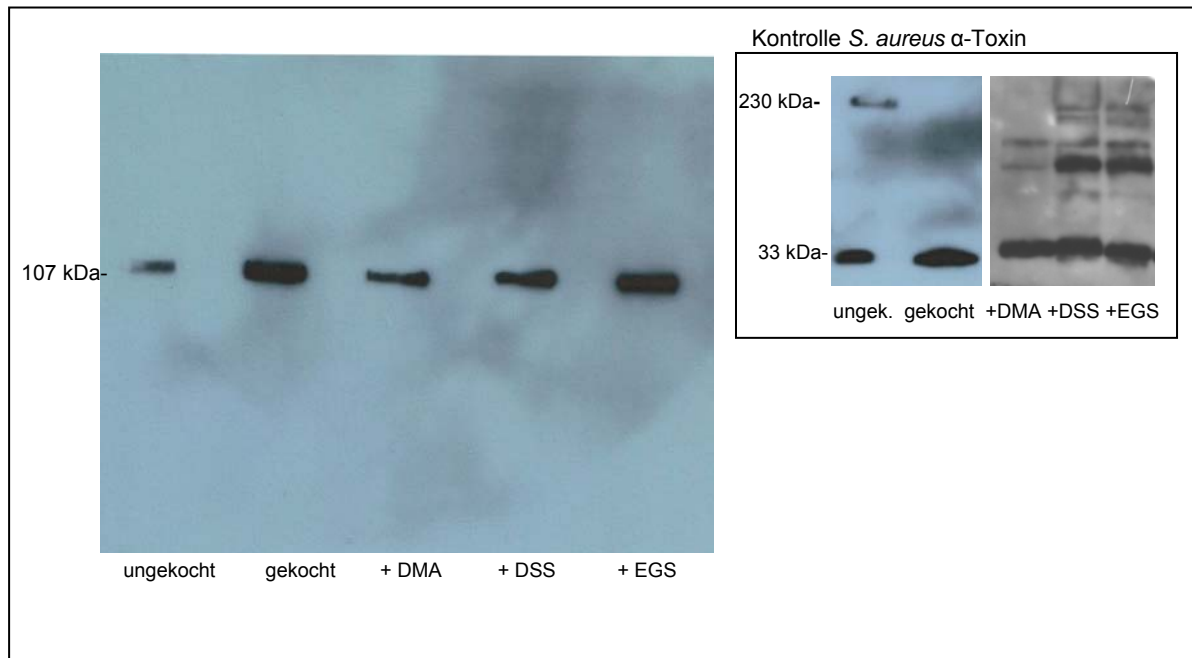


Abb. 3-6: Westernblot nach Einsatz von Crosslinkern für *E. coli* α -Hämolyisin auf künstlichen Liposomen. Sowohl ungekocht als auch gekocht mit und ohne Crosslinker weist das Toxin ausschließlich das Monomer mit einem Molekulargewicht von 107 kDa auf. Eingesetzt wurden die Crosslinker DMA, DSS und EGS. Die Proben mit Crosslinker wurden, ebenso wie die gekochte Probe ohne Crosslinker, 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Funktionalität der Crosslinker wurde im Versuch mit *Staphylococcus aureus* α -Toxins bestätigt.

Die Porenbildung auf den verwendeten Liposomen wurde mit identisch hergestellten, calceingefüllten Liposomen überprüft (Abb. 3-7). Bei dem Calceinefflux aus künstlichen Liposomen handelt es sich um einen bereits mehrfach publizierten Nachweis der porenbildenden Aktivität von HlyA (Menestrina, 1988, Ostolaza et al., 1993). Das *E. coli* α -Hämolyisin und die Positivkontrolle *S. aureus* α -Toxin wurden wie zuvor beschriebenen in einer Konzentration von 16 $\mu\text{g/ml}$ bei 37°C mit den Liposomen inkubiert, und die Calceinfreisetzung anhand der Fluoreszenz-Emission freien Calceins im Spektrofluorometer bestimmt. Als Kontrolle dienten Liposomen ohne Toxin mit und ohne Guanidin, um einen

möglichen Einfluss des Guanidins ausschließen zu können, in dem das verwendete α -Hämolyysin vorlag (nicht dargestellt). Guanidin alleine führte nicht zu einem Efflux des Calceins aus den Liposomen. Die 100%-ige Calceinfreisetzung wurde von jeder Probe ermittelt, indem die Liposomen des jeweiligen Ansatzes nach der ersten Messung durch Zugabe von 1% Triton X100 vollständig lysiert wurden. Die prozentuale Freisetzung mit Toxin wurde anhand der Fluoreszenz-Emission ohne Toxin (0%) und der mit Triton (100%) ermittelt. Wie in Abb. 3-7 dargestellt, wurde nach 10-minütiger Inkubation durch *S. aureus* α -Toxin eine 8,3%-ige Calceinfreisetzung, durch *E. coli* α -Hämolyysin eine 62%-ige Calceinfreisetzung erreicht. Nach 30-minütiger Inkubation wurde eine Freisetzung von 59 bzw. 100% erreicht.

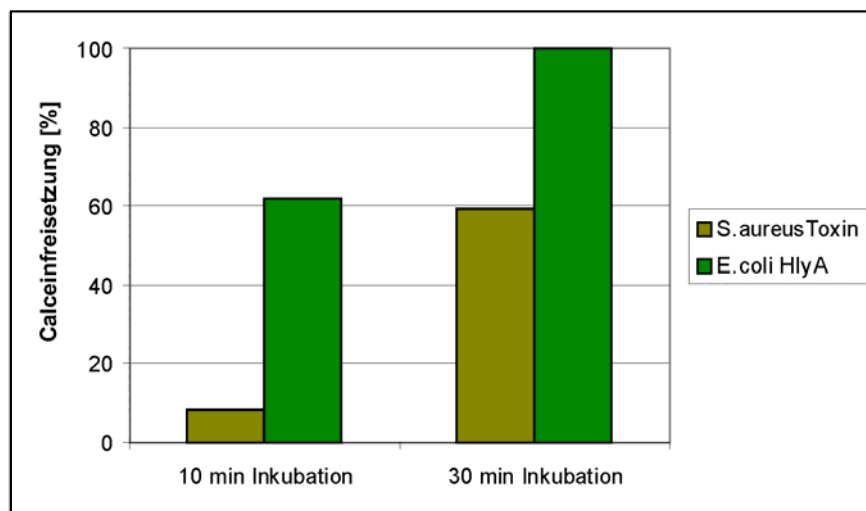


Abb. 3-7: Toxininduzierte Calceinfreisetzung aus künstlichen, calceingefüllten Liposomen. Die Liposomen wurden 10 bzw. 30 Minuten bei 37°C mit Toxin [16 μ g/ml] inkubiert und die Calceinfreisetzung anhand der Fluoreszenz-Emission des Calceins bei 538 nm bestimmt. Der Versuch diente als Kontrolle der Porenbildung unter den beim Einsatz von Crosslinkern eingesetzten Bedingungen wie Liposomen, Inkubation und Toxinkonzentration. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der drei Methoden zur Untersuchung des porenbildenden Mechanismus von α -Hämolyysin alle auf eine monomere Pore hinweisen.

3.2 Charakterisierung der N-terminalen Region von α -Hämolyysin

Die N-terminale Hälfte von HlyA besteht aus hydrophoben Domänen und bildet die porenbildende Region des Toxins (Ludwig et al., 1987, Ludwig et al., 1991, Schindel et al., 2001; Valeva et al., 2008). Ungeklärt ist bisher jedoch die Funktion der N-terminalen 176 Aminosäuren, wobei die ersten 50 Aminosäuren eine amphipathische Struktur aufweisen (Ludwig et al., 1991).

Zur Charakterisierung der N-terminalen 50-100 Aminosäuren wurden drei Toxinderivate mit Deletionen der Aminosäuren 20-40, 1-50 und 1-100 hergestellt, und der mögliche Einfluss

dieser Deletionen auf die Porenbildung untersucht. Weiterhin wurden im Bereich der HlyA-Aminosäuresequenz 13 bis 55 insgesamt 20 einzelne Cysteine eingeführt. Cysteine sind spezifisch mit Badan markierbar, und erlauben Untersuchungen zur Interaktion der entsprechenden Aminosäure mit Membranen.

3.2.1 Charakterisierung der Mutanten HlyA- Δ 20-40 und HlyA- Δ 1-50

Zur Charakterisierung der 50 N-terminalen Aminosäuren wurden zunächst zwei Toxinderivate hergestellt und aufgereinigt, bei denen die Aminosäuresequenz 20-40 (HlyA- Δ 20-40) bzw. 1-50 (HlyA- Δ 1-50) durch PCR-basierte Mutagenese deletiert worden war. Der mögliche Einfluss der Deletionen auf Hämolyse und Cytolyse wurde auf Kaninchen-Erythrozyten und auf humanen HaCat Zellen überprüft. Mögliche Änderungen der Porengröße N-terminal deletierten Toxins im Vergleich zum Wildtyp wurden durch Osmoprotektionsversuche mit PEG untersucht.

Der erste Versuchsteil fokussierte sich auf die Aktivität der deletierten Toxinderivate, wozu die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität der Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Toxin auf Kaninchen-Erythrozyten bestimmt wurde. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt, und die Ergebnisse als Mittelwert in Abb. 3-8 dargestellt. Der Kurvenverlauf der hämolytischen Aktivität der Toxine mit Deletionen des N-Terminus wies keine signifikanten Unterschiede zum Verlauf des Wildtyp-Toxins auf. Sowohl das Toxin HlyA- Δ 1-50 als auch das Wildtyp-Toxin bewirkten eine 90-100%-ige Hämolyse bis zu einer Konzentration von ca. 1,8 μ g/ml, danach nahm die Aktivität bei beiden Toxinen gleichmäßig bis zu einer Konzentration von etwa 27,75 ng/ml auf eine kaum noch bestimmbare Hämolyse von unter 10% ab. Da die beiden Toxine HlyA- Δ 20-40 und HlyA- Δ 1-50 keine Unterschiede aufwiesen, wurde auf die Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivität von HlyA- Δ 20-40 verzichtet.

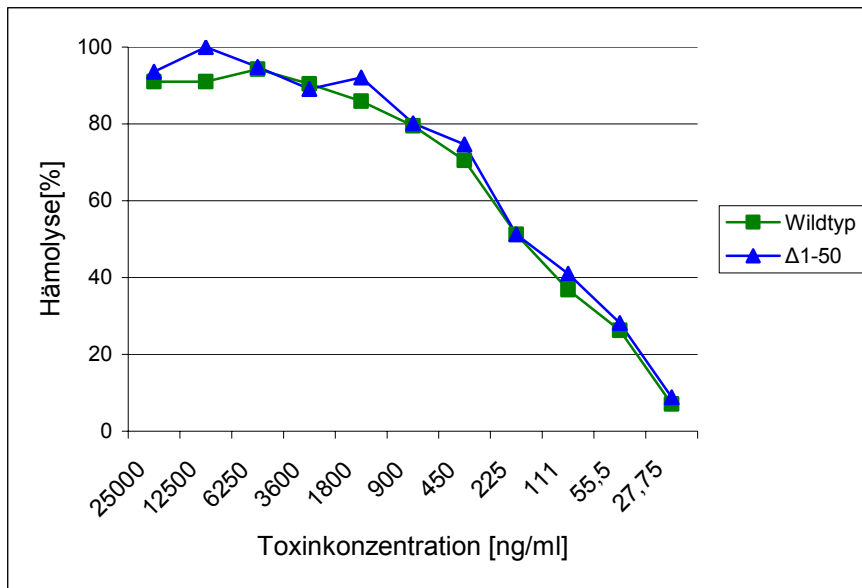


Abb. 3-8: Vergleich der konzentrationsabhängigen hämolytischen Aktivität des HlyA-Derivates $\Delta 1-50$ im Vergleich zu Wildtyp-HlyA. Die Toxine wurden schrittweise 1:1 verdünnt, und mit 1,25 %-igen Kaninchenerythrozyten inkubiert. Die prozentuale Hämolyse wurde photometrisch bei 412 nm bestimmt. Das dargestellte Ergebnis resultiert aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Versuche.

Zur Bestätigung der Annahme, dass eine Deletion der 50 N-terminalen Aminosäuren keine zelltypspezifische Auswirkung auf die lytische Aktivität des α -Hämolysins hat, wurde die Aktivität des HlyA-Derivates HlyA- $\Delta 1-50$ im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich auf humanen Keratinozyten (HaCat-Zellen) bestimmt. Dies erfolgte durch Messung der intrazellulären ATP-Konzentration, die umgekehrt proportional zur prozentualen Lyse der Zelle ist, nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit Toxinkonzentrationen von 62,5 bis 1000 ng/ml. Bei Porenbildung kommt es zu einem konzentrationsabhängigen ATP-Verlust der Zelle. Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde mit Hilfe der Luziferase-Reaktion ermittelt, und die prozentuale Zellyse in Abb. 3-9 dargestellt. Eine 40-50%-ige Hämolyse wurde sowohl mit Wildtyp-HlyA als auch mit HlyA $\Delta 1-50$ in einer Toxinkonzentration von 62,5 ng/ml erreicht.

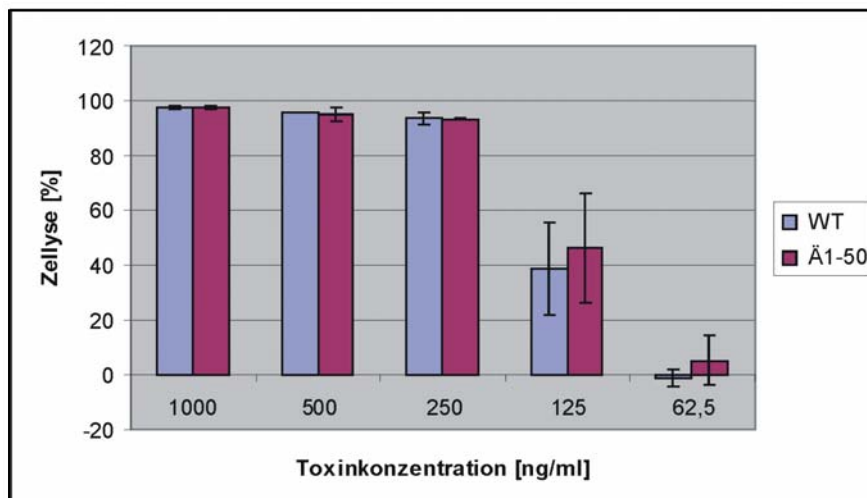


Abb. 3-9: Lyse humaner Keratinozyten nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Wildtyp-Toxins und HlyA- $\Delta 1-50$. Das dargestellte Ergebnis resultiert aus zwei unabhängigen Versuchen und ist repräsentativ für weitere Versuchsdurchführungen mit vergleichbaren Resultaten. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Abweichung der Einzelmessung von dem dargestellten Mittelwert dar.

Das Derivat HlyA- Δ 1-50 wies keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp-Toxin auf. Beide Toxine führten in Konzentrationen von etwa 220ng/ml zu einem etwa 50%-igen ATP-Verlust der Zellen.

Die Untersuchung der cytolytischen Aktivität der Deletionsmutante bestätigte das oben aufgeführte Ergebnis der Hämolyse: die Deletion der N-terminalen 50 Aminosäuren beeinflusst die lytische Aktivität von α -Hämolysin nicht. Diese Aussage kann sowohl für Kaninchenerythrozyten als auch für humane Keratinozyten getroffen werden, und ist somit möglicherweise allgemein für verschiedene Zelltypen gültig.

Der osmotisch protektive Einsatz von Polyethylenglykol (PEG) bei der Hämolyse liefert Hinweise auf die Größe der von Toxinen gebildeten Poren, da sich der molekulare Radius von PEG unterschiedlichen Molekulargewichts voneinander unterscheidet (siehe auch Tab. 2-4). In der vorliegenden Arbeit wurden PEG 300 (~0,58 nm), PEG 400 (~0,68 nm) und PEG 600 (~0,8 nm) zur Untersuchung möglicher Größenunterschiede der von HlyA- Δ 1-50 gebildeten Pore im Vergleich zum Wildtyp verwendet. Die Toxine wurden in einer Konzentration von etwa 300 ng/ml eingesetzt, die ohne wirksamen Protektor zu einer 90-100%-igen Hämolyse 1,25%-iger Kaninchenerythrozyten führte. Die ermittelte prozentuale Hämolyse mit und ohne Protektor ist in Abb. 3-10 dargestellt. Mit PEG 300 wurde die Hämolyse sowohl bei Wildtyp-Toxin als auch bei HlyA- Δ 1-50 nicht signifikant beeinträchtigt. PEG 400 führte bei den Toxinen zu einer Verminderung der Hämolyse auf etwa 50% bei dem N-terminal deletierten Toxin und etwa 60% beim Wildtyp-Toxin, während die Hämolyse durch PEG 600 verhindert wurde. Die Resultate von Wildtyp und Derivat wichen nur unwesentlich voneinander ab und waren im Rahmen der Messgenauigkeit miteinander vergleichbar. Das Ergebnis zeigt, dass der Radius der Pore durch Deletion der N-terminalen 50 Aminosäuren nicht verändert wurde, und bestätigt die Annahme der vorhergegangenen Versuche, dass der N-Terminus von HlyA nicht an der Porenbildung beteiligt ist.

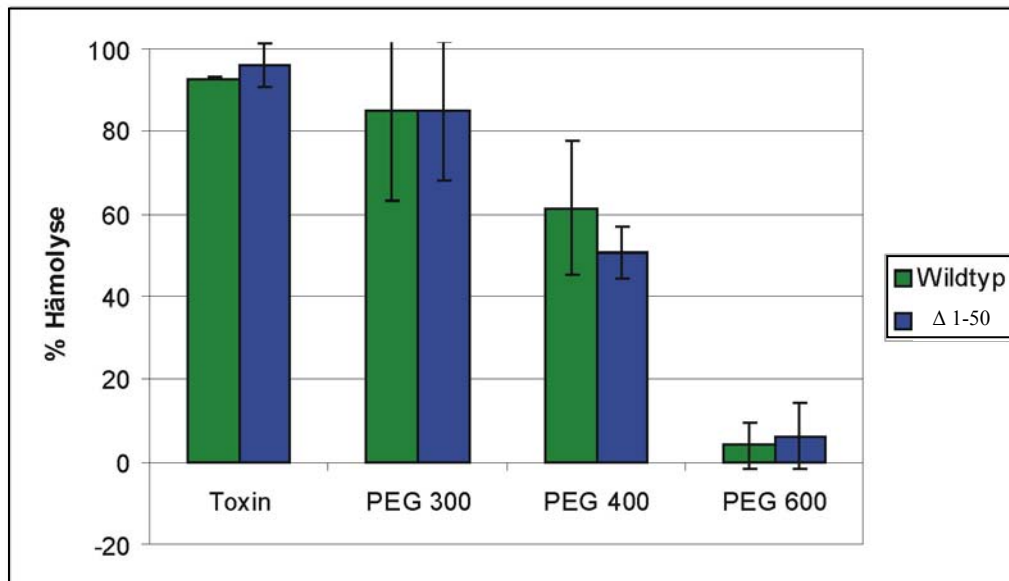


Abb. 3-10: Schutzversuche zum Vergleich der Porengröße von Wildtyp-HlyA und dem Derivat HlyA- Δ 1-50. Als Protektoren wurden PEG 300, PEG 400 und PEG 600 eingesetzt. Wildtyp und Deletionsmutante wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Der Versuch wurde mehrfach durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Abweichung der Einzelmessung von dem dargestellten Mittelwert dar.

3.2.2 Charakterisierung der Mutante HlyA- Δ 1-100

Zur Untersuchung der Funktion der 100 N-terminalen Aminosäuren wurde ein Toxinderivat mit Deletion der Aminosäuren 1-100 (HlyA- Δ 1-100) hergestellt und aufgereinigt. Die Menge sekretierten Toxins unterschied sich nicht von der bei Wildtyp-Toxin üblichen Menge: Aus zwei Liter Bakterienkultur ($OD_{600}=1$) erhielt man etwa ein Milligramm Toxin. Die hämolytische Aktivität wurde durch einen Hämolysetiter im Vergleich mit dem Wildtyp untersucht. Eine etwa 50 %-ige Hämolyse von 1,25%-igen Kaninchenerythrozyten wurde mit HlyA- Δ 1-100 bei einer Konzentration von etwa 2800 ng/ml erreicht. Für eine vergleichbare Hämolyse durch Wildtyp-Toxin wurden dagegen nur etwa 80 ng/ml eingesetzt, d.h. die hämolytische Aktivität von HlyA wurde durch die Deletion der N-terminalen 100 Aminosäuren um den Faktor 35 reduziert (nicht dargestellt).

Auch die Untersuchung der lytischen Aktivität auf humanen Keratinozyten (HaCat Zellen) bestätigte die stark verminderte Aktivität der Deletionsmutante: während Wildtyp-Toxin in einer Konzentration von 1 μ g/ml bei 30-minütiger Inkubation zu einem 100%-igen ATP-Verlust der Zellen führte, wies das Toxinderivat Δ 1-100 in derselben Konzentration keinerlei lytische Aktivität aus (nicht dargestellt). Das Ergebnis zeigt deutlich, dass es sich bei der Reduktion der lytischen Aktivität durch die Deletion nicht um ein für Kaninchenerythrozyten spezifisches Ergebnis handelt.

Die hämolytische Aktivität von HlyA- Δ 1-100 wurde zusätzlich durch Kultivierung der Mutante auf Blutagar überprüft, um die Denaturierung und anschließende Renaturierung des Toxins

während des Reinigungsprozesses zu vermeiden. Die Deletion von Proteinbereichen kann möglicherweise dazu führen, dass nach einer Denaturierung eine nur unvollständige korrekte Faltung während der Renaturierung erfolgt. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* MC 1061 + pLG575 wurde nach Transformation mit dem das entsprechende Toxin codierende Plasmid pyA-WT (bzw. Derivat Δ 1-100) über Nacht auf Blutagar kultiviert (nicht dargestellt). Beim Wildtyp-Toxin zeigte sich die Hämolyse der Erythrozyten durch einen durchsichtigen Hof im Bereich der Bakterienkolonien. Dieser Bereich war bei HlyA- Δ 1-100 im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner. Das Ergebnis bestätigt somit das oben aufgeführte Resultat, dass eine Deletion der N-terminalen 100 Aminosäuren zu einer deutlich verringerten hämolytischen Aktivität führt. Die Annahme, dies könne alleine auf einer unvollständigen korrekten Faltung bei der Renaturierung des im Verlaufe der Toxinaufreinigung denaturierten Proteins beruhen, konnte durch diesen Versuch mit Blutagar widerlegt werden.

Die Bindung von HlyA- Δ 1-100 wurde auf Erythrozytenmembranen (Ghosts) von Kaninchen- und Humanerythrozyten im Vergleich zu dem lytisch aktiven HlyA-Derivat HlyA-S288C überprüft. Wie in Abbildung 3-11 dargestellt ist, wurde die Bindung von HlyA durch die Deletion der Aminosäuresequenz 1 bis 100 nicht beeinträchtigt, sondern das deletierte Toxin band in vergleichbarer Menge irreversibel an die Zellmembranen wie lytisch aktives HlyA.

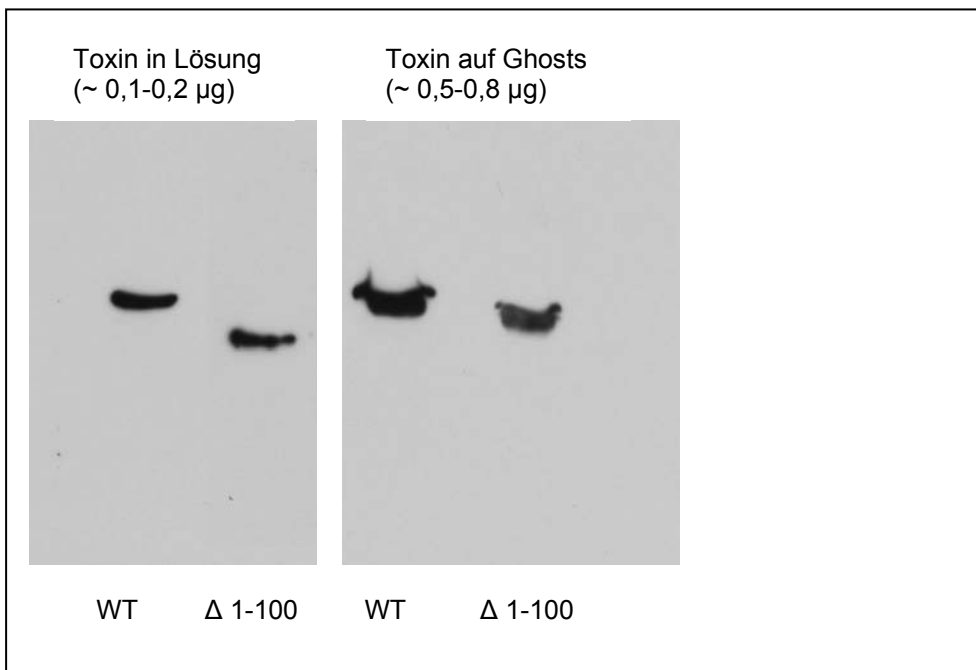


Abb. 3-11: Westernblot: Bindungsstudien der Toxin-Deletionsmutante HlyA- Δ 1-100 im Vergleich zu Wildtyp-HlyA. Zum Vergleich der Toxinkonzentration wurden die beiden Toxine als Kontrolle in Lösung aufgetragen. Die Bindung an Ghosts erfolgte für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln. Anschließend wurden die Ghosts zweimal gewaschen, um ungebundenes Toxin zu entfernen, und dann in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Der Versuch war sowohl auf Kaninchenghosts als auch auf Humanghosts mehrfach reproduzierbar.

Durch Protektionsversuche (siehe auch Kapitel 3.2.1) mit PEG 300, PEG 400 und PEG 600 wurde HlyA- Δ 1-100 auf eine mögliche Veränderung der Porengröße im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Abb. 3-12). Wildtyp-Toxin wurde in einer Konzentration von etwa 300 ng/ml eingesetzt, wodurch ohne Protektoren eine etwa 92%-ige Hämolyse der 1,25%-igen Kaninchenerythrozyten erreicht wurde. HlyA- Δ 1-100 musste in einer Konzentration von etwa 3000 ng/ml eingesetzt werden, um eine etwa 60%-ige Hämolyse zu erreichen. Die Resultate mit den unterschiedlichen Protektoren weisen nicht auf eine Änderung der Porengröße hin. Bei beiden Toxinen erfolgte erst mit PEG 600 ein (nahezu) 100%iger osmotischer Schutz der Erythrozyten.

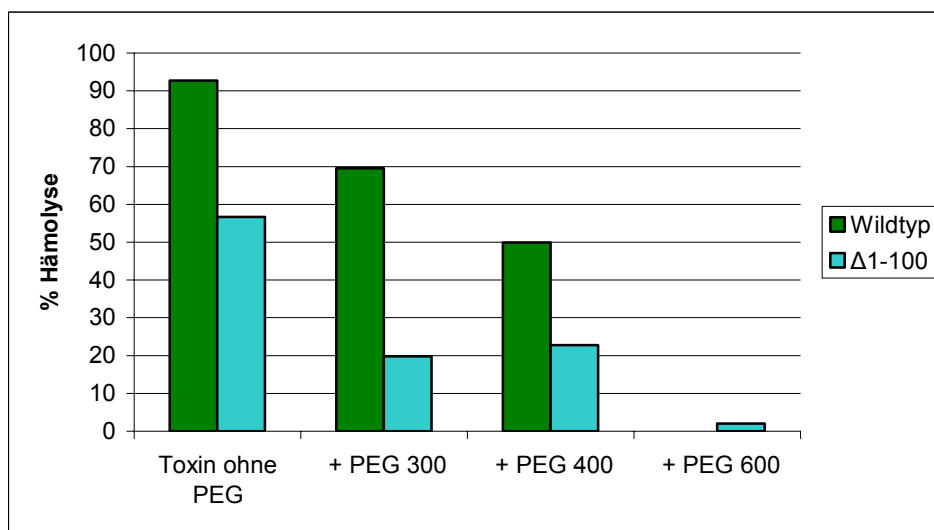


Abb. 3-12: Osmo-Protektion zur vergleichenden Darstellung der Porengröße von Wildtyp-HlyA und HlyA- Δ 1-100. Als Protektoren wurden PEG 300, PEG 400 und PEG 600 eingesetzt. Wildtyp-HlyA wurde in einer Konzentration von 300 ng/ml eingesetzt, das nur geringfügig lytische Toxinderivat HlyA- Δ 1-100 in der 10-fachen Konzentration [3000 ng/ml].

3.2.3 Untersuchung möglicher Interaktionen des N-Terminus mit Membranen

Die Einführung von Cysteinen in die Cysteinfreie Aminosäuresequenz von HlyA erlaubt nach SH-Gruppen-spezifischer Markierung mit Badan Untersuchungen zur möglichen Insertion der entsprechenden Aminosäure in die Membran. Das badanmarkierte Protein in Lösung weist in der Regel ein Fluoreszenzmaximum zwischen etwa 490-500 nm auf. In Abbildung 3-13 sind exemplarisch die Fluoreszenzmessungen des Toxinderivates HlyA-A27C dargestellt. Bei Insertion der markierten Aminosäure in die hydrophobe Membran erfolgt eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zum kurzwelligeren Bereich („Blueshift“). Bei Lyse der Membran und der damit verbundenen Änderung der Umgebung des Badans kommt es zu einem „Rückshift“ des Maximums. Der „Rückshift“ ist in der Regel nicht ganz so groß wie der „Blueshift“. Erklärungen hierfür sind unvollständige Membranlyse oder evtl. konformationelle Änderungen des Toxins durch die Interaktion mit der Membran, die auch bei der anschließenden Lyse der Membran zumindest teilweise erhalten bleiben.

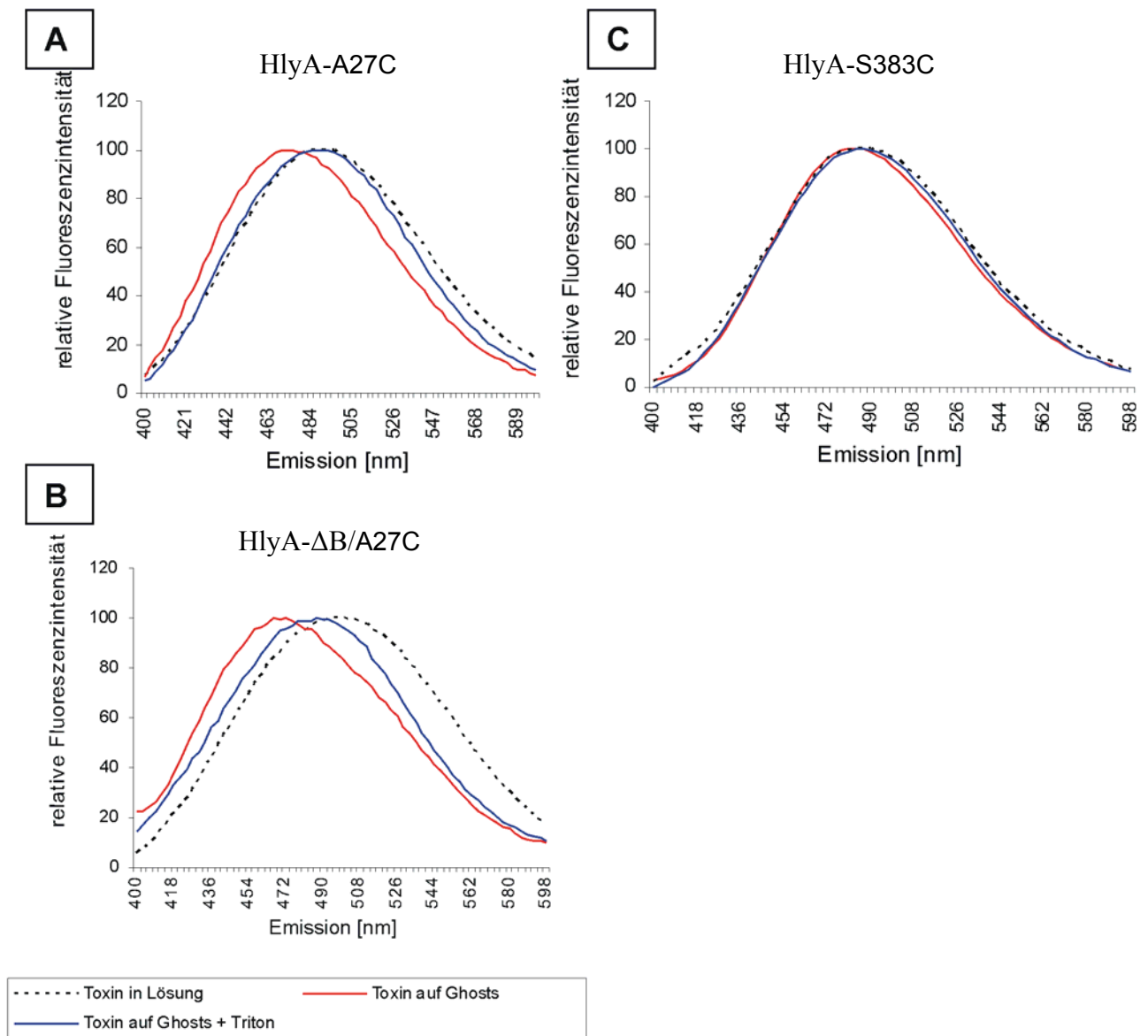


Abbildung 3-13: Fluoreszenz-Emissionsspektren des Badanmarkierten HlyA-Derivates S27C (A) und des monoacylierten, nicht lytischen HlyA-Derivates Δ B/S27C (B). Beide Toxine zeigen eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in den kurzwelligeren Emissionsbereich („Blue-Shift“) bei Interaktion mit Erythrozytenmembranen im Vergleich zu Toxin in Lösung, sowie einen „Rückshift“ nach der Membranlyse mit Triton. Zum Vergleich wurde das Spektrum des HlyA-Derivates S383C aufgeführt (C), bei dem keine Verschiebung der Emission erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden innerhalb der Aminosäuren 1-55 von HlyA insgesamt 21 einzelne Cysteine durch zielgerichtete Mutagenese eingeführt und fluoreszenzspektrometrisch auf Membraninsertion untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Funktion des N-Terminus zu erhalten. Die Toxinderivate und die Ergebnisse der fluoreszenzspektrometrischen Messungen sind in Abbildung 3-14 zusammengefasst. Bei allen Toxinmutanten kam es nach Inkubation mit Kaninchenghosts im Vergleich zu Toxin in Lösung zu einem „Blueshift“ der Badanemission von 11 bis 32 nm. Durch Lyse der Ghosts mit 1% Triton erfolgte ein „Rückshift“ von 3,5 bis 19 nm. Dieses Ergebnis weist auf die Insertion aller untersuchten markierten Aminosäuren in die Membran hin, ohne dass eine

Periodizität in Bezug auf den „Blueshift“ erkennbar ist, wie sie von einer porenbildenden Region erwartet wird, bei der ein Teil der Aminosäuren in die hydrophile Pore ragt, während der andere Teil in der hydrophoben Membran verankert ist (Valeva et al., 2008). Der N-Terminus inseriert demnach vollständig in die Membran, ohne direkt an der Porenbildung beteiligt zu sein.

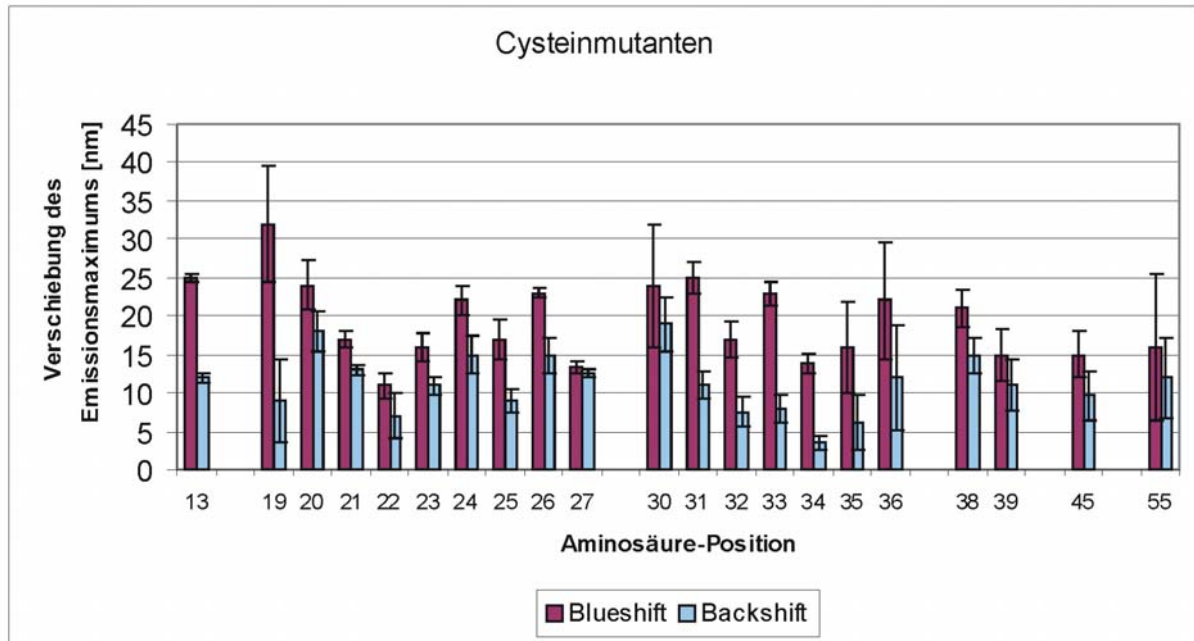


Abb. 3-14: Verschiebung des Badan-Fluoreszenzmaximums bei Toxinderivaten mit N-terminal eingeführten Cysteinen. Mit aufgeführt sind die Messungen der Aminosäure 30, die bereits vor Beginn dieser Arbeit vorlagen (Valeva et al., 2008). Die Verschiebung zur kurzwelligeren Emission („Blueshift“) erfolgte nach Bindung der Toxine an Kaninchenghosts im Vergleich zu Toxin in Lösung, die Rückverschiebung („Backshift“) nach der anschließenden Lyse der Membran mit Triton. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte jeweils in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Werte resultieren aus dem Mittelwert der Messungen. Die mittlere Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert ist als Fehlerbalken dargestellt.

Zur Untersuchung der N-terminalen Membraninsertion in Abhängigkeit von der Porenbildung wurde der Großteil der Cysteinsubstituierten Toxine auch mit einer zweiten Mutation, dem Austausch des für die Porenbildung essentiellen, fettsäureacylierten Lysins 690 gegen Arginin (ΔB), hergestellt. Die Fluoreszenzspektren dieser monoacylierten, nicht-lytischen Toxinderivate ähnelten im Wesentlichen denen der lytischen Toxine (siehe auch Abb. 3-13); es erfolgte bei allen markierten Aminosäuren ein „Blueshift“ des Badan-Emissionsmaximums auf Kaninchenghosts und ein „Rückshift“ nach Lyse der Membran mit Triton (Abb. 3-15). Alle Cysteine inserierten demnach auch ohne die Fettsäureacylierung von Lysin 690 in die Membran. Dieses Ergebnis spricht für eine von Interaktion des N-Terminus mit der Zielmembran, die unabhängig von der Modifikation des Toxins und vom Prozess der Porenbildung erfolgt.

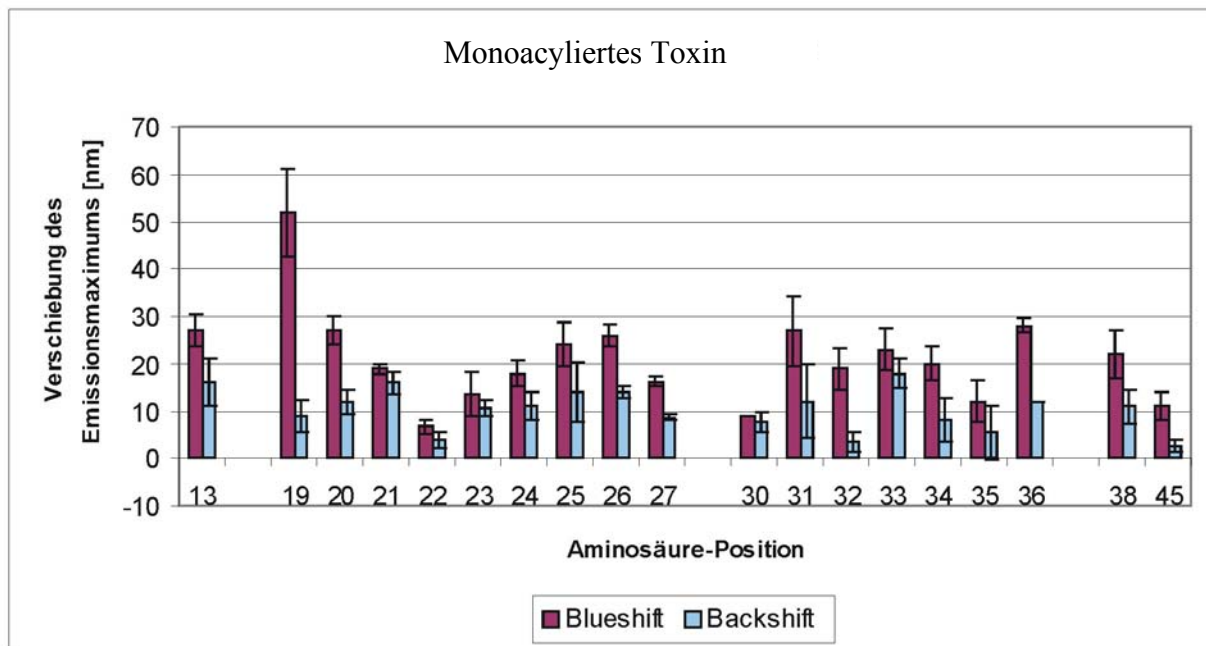


Abb. 3-15: Verschiebung des Emissionsmaximums von Badan bei nicht-lytischen Toxinderivaten (ΔB) mit N-terminal eingeführten Cysteinen. Die Toxine sind nicht-lytisch aufgrund der zusätzlichen Mutation von Lysin 690, und die dadurch fehlende essentielle Fettsäureacylierung. Die Verschiebung zur kurzwelligeren Emission („Blueshift“) erfolgte nach Bindung der Toxine an Kaninchenghosts im Vergleich zu Toxin in Lösung, die Rückverschiebung zur langwelligen („Backshift“) bei der anschließenden Lyse der Membran mit Triton. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte jeweils in drei unabhängigen Versuchen. Die dargestellten Werte resultieren aus dem Mittelwert der Messungen. Die mittlere Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert ist als Fehlerbalken dargestellt.

Eine weitere Kontrolle lieferte das nicht acylierte Toxinderivat HlyA- $\Delta AB/S26C$, bei der die beiden Lysine 564 und 690 ausgetauscht und somit die Fettsäureacylierung von HlyA vollständig verhindert worden war. Das Fluoreszenzverhalten des nicht acylierten HlyA-Derivates HlyA- $\Delta AB/S26C$ im Vergleich zum monoacylierten Derivat HlyA- $\Delta B/S26C$ und dem lytischen, acylierten Derivat HlyA-S26C ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Die Fluoreszenzspektren des acylierten, monoacylierten und nicht acylierten Toxins zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Verschiebung des Emissionsmaximums durch Toxin-Interaktion mit Ghosts, und alle drei Toxinmutanten wiesen eine Verschiebung zum längerwelligen Emissionsbereich nach der Lyse der Ghosts auf. Das Ergebnis bestätigt die Resultate der monoacylierten Toxine (ΔB), dass die Membraninsertion des N-Terminus von HlyA unabhängig von der für die Porenbildung essentiellen Fettsäureacylierung erfolgt.

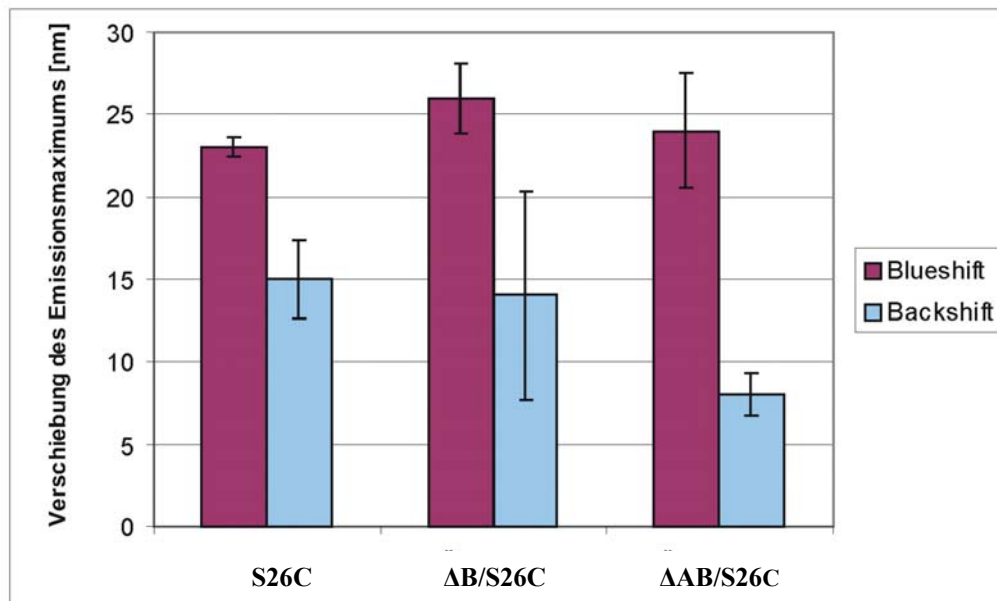


Abb. 3-16: Verschiebung der Emissionsmaxima bei dem Badanmarkierten HlyA-Derivat S26C auf Ghosts (Blueshift) und nach Lyse der Ghosts mit Triton (Backshift) im Vergleich zu dem entsprechenden monoacylierten Toxinderivat $\Delta B/S26C$ (Mutation Lysin 690) und dem nicht acylierten Toxinderivat $\Delta AB/S26C$ (Mutation Lysine 564 und 690). Die mittlere Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert ist als Fehlerbalken dargestellt.

3.3 Charakterisierung putativ porenbildender Regionen von α -Hämolyysin

Die Einführung von Prolinen innerhalb einer α -Helix verändert die α -helicale Struktur und ihre Eigenschaften. α -Helices besitzen häufig hydrophobe Eigenschaften, und bilden bei vielen Transmembranproteinen die membraninserierende Struktur. Die Einführung von zwei Prolinen in eine α -Helix, vor allem im N- oder C-terminalen Bereich der Helix, resultiert in der Regel in einer stark eingeschränkten bzw. verhinderten Membraninsertion (Caputo & London, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Toxine mit Doppelprolinsubstitution hergestellt, um mögliche porenbildende Regionen innerhalb der Sequenz von HlyA zu identifizieren. In vorausgegangenen Arbeiten wurde bei α -Hämolyysin die Verhinderung der Porenbildung durch Einführung zweier Proline an Position 284 und 287 in der porenbildenden Region 282-298 erreicht, während die Einführung von Prolinen in eine andere Region des Toxins (254P/257P) ohne Einfluss auf die hämolytische Aktivität blieb (Valeva et al., 2008). Anhand von Untersuchungen zu Membraninteraktionen essentieller, putativ α -helicaler Bereiche durch Cysteinsubstitutionen und Badanmarkierung kann zudem deren Beteiligung an der Porenbildung analysiert werden.

3.3.1 Charakterisierung von Doppelprolinsubstituierten HlyA-Derivaten zur Identifizierung möglicher porenbildender Regionen in HlyA

Zu Beginn der Arbeit wurden mit dem Programm PredictProtein (Rost & Liu, 2003) anhand der Aminosäuresequenz von HlyA putative α -Helices in der N-terminalen Hälfte des Toxins bestimmt (Valeva et al., 2008). Durch zielgerichtete Mutagenese wurden jeweils zwei Proline in ausgesuchte Bereiche der Aminosäuresequenz von HlyA eingeführt, um die Struktur der

entsprechenden putativen α -Helices zu verändern. Bei membraninserierenden α -Helices wird in diesem Fall die Reduktion der Insertion und damit eine Beeinträchtigung der HlyA-Aktivität erwartet. Als Matrize bei der Mutagenese diente das modifizierte Plasmid pYA-WT mit der Mutation S288C (Schindel et al., 2001); dies erlaubte spätere Untersuchungen der Toxine in Bezug auf die Interaktion der porenbildenden Region 278-298 mit Membranen durch die Cysteinmarkierung mit Badan. Dreizehn HlyA-Derivate mit Doppelprolinsubstitution wurden im Rahmen der Arbeit angefertigt (Tabelle 3-1). Die aufgereinigten Toxine wurden auf ihre hämolytische Aktivität im Hämolysetiter getestet. Die Mutanten und das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung sind in Tabelle 3-1 und in Abbildung 3-17 dargestellt.

Tab. 3-1: HlyA-Derivate mit Doppelprolinsubstitution unter Angabe der putativ α -helicalen Aminosäurebereiche und der hämolytischen Aktivität. Eine nicht beeinträchtigte hämolytische Aktivität entspricht ungefähr einer 50%-igen Hämolyse von 1,25%-igen Kaninchenerythrozyten durch etwa 80 ng Toxin/ml.

Toxinderivat	Putativ α-helicaler Bereich (Aminosäuren)	Hämolytische Aktivität
L139P/A142P/288C	132-167	nicht beeinträchtigt
I188P/L191P/S288C	177-217	nicht beeinträchtigt
S214P/S217P/S288C	177-217	nicht beeinträchtigt
G224P/N227P/S288C	177-230	nicht beeinträchtigt
S288C/I310P/A313P	307-316	nicht lytisch
S288C/A333P/I336P	321-345	eingeschränkt [7 μ g/ml]
S288C/S352P/A355P	350-358	nicht beeinträchtigt
S288C/I371P/V374P	366-377	nicht lytisch
S288C/A397P/G400P	–	eingeschränkt [0,6 -1,2 μ g/ml]
S288C/S413P/A416P	406-432	eingeschränkt [0,3 – 0,6 μ g/ml]
S288C/A447P/A450P	445-472	nicht lytisch
S288C/I484P/L487P	476-490	eingeschränkt [10 μ g/ml]
S288C/S499P/S502P	494-508	nicht beeinträchtigt

Die HlyA-Derivate L139P/A142P/288C, I188P/L190P/288C, S214P/S217P/288C, G224P/N227P/288C und S288C/S499P/S502P wiesen keinen Unterschied der hämolytischen Aktivität zum Wildtyp auf, und wurden daher nicht näher charakterisiert. Die Derivate S288C/A333P/I336P, S288C/A397P/G400P, S288C/S413P/A416P und S288C/I484P/L487P zeigten unterschiedlich starke Einschränkungen ihrer hämolytischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis deutet auf eine Bedeutung der putativ α -helicalen Struktur dieser Aminosäure-Bereiche für die hämolytische Funktion des Hämolsins hin. Die hämolytische Aktivität wurde durch Einführung dieser Proline zum Teil stark beeinträchtigt. Die drei Toxinderivate S288C/I310P/A313P, S288C/S352P/A355P und

S288C/A447P/A450P waren nicht-lytisch bei allen eingesetzten Toxinkonzentrationen (bis etwa 10 µg/ml). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die α -helicale Struktur dieser Bereiche essentiell für die lytische Aktivität des Toxins ist, und sie möglicherweise direkt in die Porenbildung involviert sind. Weitere Untersuchungen auf porenbildende Regionen innerhalb des Toxins wurden daher besonders auf diese Bereiche fokussiert.

3.3.2 Untersuchung eingeschränkt lytischer und nicht-lytischer doppelprolinsubstituierter HlyA-Derivate in Bezug auf die porenbildende Region 272 bis 298

Die eingeschränkt lytischen HlyA-Derivate S288C/A333P/I336P, S288C/A397P/G400P, S288C/S413P/A416P und S288C/I484P/L487P und die nicht-lytischen HlyA-Derivate S288C/I310P/A313P, S288C/I371P/V374P und S288C/A447P/A450P wurden Cystein-spezifisch mit Badan markiert, um die Interaktion der porenbildenden Region 272-298 mit Erythrozytenmembranen (Ghosts) fluoreszenzspektrometrisch zu untersuchen. Diese Messungen sollten zeigen, ob sich die Mutationen auf die einzige bisher eindeutig identifizierte porenbildende Region (Valeva et al., 2008) des Toxins auswirken. Gleichzeitig sollte durch diese Untersuchung gezeigt werden, ob die Bindungsfähigkeit der Toxine durch die Mutation eingeschränkt wird: bei allen gemessenen Mutanten war nach Bindung an Ghosts trotz mehrfacher Waschschriffe zur Entfernung ungebundenen Toxins die Fluoreszenz des Badans im für aktives HlyA üblichen Intensitätsbereich messbar, d.h. die Bindung des Toxins an Erythrozytenmembranen wurde durch die Mutationen nicht eingeschränkt. Die eingeschränkt hämolytisch aktiven HlyA-Derivate zeigten nach Badanmarkierung der Aminosäure 288 alle sowohl eine Verschiebung des Emissionsmaximums in einen kurzwelligeren Emissionsbereich um etwa -9 bis -20 nm („Blueshift“) bei Interaktion mit Membranen, als auch eine Rückverschiebung um etwa 6 bis 9 nm („Rückshift“) bei anschließender Membranlyse mit Triton (Tab. 3-2). Diese Messungen belegen, dass die Membraninsertion der porenbildenden Region 272-298 durch die Einführung der Proline nicht verhindert wurde.

Das Fluoreszenzspektrum des badanmarkierten Cysteins an Position 288 des nicht-lytischen HlyA-Derivates S288C/I310P/A313P deutet auf die Bildung von Toxinaggregaten durch Einführung der beiden Proline hin: das Toxin zeigte bereits in Lösung ein deutlich in den kurzwelligen Wellenlängenbereich verschobenes Emissionsmaximum, dass sich bei Zugabe von Triton ins langwelligere Spektrum verschob. Möglicherweise verursacht diese Neigung zur Bildung von Aggregaten die lytische Inaktivität der Mutante.

Bei dem nicht-lytischen HlyA-Derivat S288C/I371P/V374P zeigte die Badanmarkierte Aminosäure 288, genau wie beim lytischen Derivat S288C (Valeva et al., 2008), eine deutlichen Verschiebung von etwa -20 nm, und einen Rückverschiebung von 8-9 nm. Die Insertion der porenbildenden Region 278-298 mit der Membran wurde demnach durch Prolinsubstitution der Aminosäuren 371 und 374 nicht beeinträchtigt, was eine direkte Interaktion der beiden Regionen im Bereich der Aminosäuren 280 und 370 bei der Porenbildung als unwahrscheinlich erscheinen lässt. Dagegen wurde im Fall des nicht-lytischen HlyA-Derivates S288C/A447P/A450P keine Verschiebung der Emission durch

Membraninteraktion gemessen. Der porenbildende Bereich 272 bis 298 konnte demnach durch die Prolinsubstitution der Aminosäuren 447 und 450 nicht mehr in die Membran inserieren. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der beiden Toxinbereiche um die Aminosäuren 280 und 450 herum hin, oder um eine Strukturänderung des Toxins, die sich auf die porenbildende Region 278-292 auswirkt und deren Membraninsertion verhindert.

Tab.3-2: Verschiebung der Emissionsmaxima der Badanmarkierten Aminosäure 288C in HlyA-Derivaten mit Doppelprolinsubstitution. Dargestellt ist neben der hämolytischen Aktivität der Toxine die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums nach der Bindung an Ghosts im Vergleich zu Toxin in Lösung, sowie die Rückverschiebung nach der anschließenden Lyse der Ghosts mit Triton. n.b. = nicht bestimmt

AS-Position Proline	Hämolytische Aktivität	Verschiebung E _{max} von 288C auf Ghosts (Shift)	Verschiebung E _{max} von 288C nach Membranlyse (Backshift)
139 / 142	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.
188 / 191	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.
214 / 217	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.
224 / 227	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.
310 / 313	nicht lytisch	Bildung von Aggregaten	
333 / 336	eingeschränkt [7 µg/ml]	-16 nm	6 nm
352 / 355	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.
371 / 374	nicht lytisch	-20 nm	9 nm
397 / 400	eingeschränkt [0,6 - 1,2 µg/ml]	-12 nm	7 nm
413 / 416	eingeschränkt [0,3 – 0,6 µg/ml]	-9 nm	6 nm
447 / 450	nicht lytisch	kein Shift	kein Shift
484 / 487	eingeschränkt [10 µg/ml]	-20 nm	9 nm
499 / 502	nicht beeinträchtigt	n.b.	n.b.

3.3.3 Membran-Interaktionsstudien essentieller, putativ α -helicaler Aminosäure-Bereiche

Die im ersten Versuchsteil als essentiell charakterisierten putativen α -Helices wurden durch Einführung von einzelnen Cysteinen und deren Badanmarkierung auf Membraninsertion untersucht. Bei der Interaktion mit Membranen wird eine Verschiebung des Badan-Fluoreszenzmaximums zum kurzwelligeren Emissionsbereich erwartet. Vor diesen Untersuchungen wurden die gereinigten Toxine im Hämolysetiter mit Kaninchenerthrozyten auf ihre hämolytische Aktivität überprüft. Alle im Rahmen der Arbeit hergestellten und

nachfolgend aufgeführten Cysteinsubstituierten HlyA-Derivate zeigten uneingeschränkte Wildtyp-Aktivität, d.h. eine etwa 50%-ige Hämolyse 1,25%-iger Kaninchenerythrozyten durch etwa 80 ng Toxin/ml.

Im Bereich der nicht-lytischen Toxinmutante S288C/I310P/A313P wurden die Aminosäuren 310, 311 und 313 cysteinsubstituiert (HlyA-Derivate HlyA-I310C, HlyA-A311C und HlyA-A313C). Die fluoreszenzspektrometrischen Messungen des Toxins I310C deuteten auf die Bildung von Aggregaten hin und waren nicht auswertbar. HlyA-A311C zeigte einen starken „Blueshift“ auf Ghosts, aber keinen signifikanten „Rückshift“ nach Membranlyse mit Triton; dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf intramolekulare Interaktionen und/oder Veränderungen der Proteinkonformation in diesem Bereich durch die Interaktion des Toxins mit Membranen, jedoch kein Hinweis auf die Insertion der Aminosäure 311 in die Membran. Die Messungen von HlyA-A313C wiesen auf eine „hydrophobe“ Proteintasche hin, in der sich die Aminosäure befindet, da das Fluoreszenzmaximum bereits in Lösung mit 466 nm bei einem relativ kurzwelligen Emissionsbereich lag. Durch Interaktion des Toxins mit Erythrozytenmembranen kam es in diesem Fall zu keiner Veränderung des Emissionsspektrums, d.h. dass auch diese Aminosäure vermutlich nicht direkt in die Membran inseriert. Trotz der vollständigen Hemmung der hämolytischen Aktivität durch Prolinsubstitution der Aminosäuren 310 und 314 konnte eine Interaktion der Aminosäuren 310, 311 und 313 mit der Membran nicht bestätigt werden. Somit handelt es sich bei diesem Bereich von HlyA mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht um eine porenbildende Region; eine bedeutende Rolle für die Konformation des lytisch aktiven Toxins ist jedoch auf Grund der Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

Im Bereich der nicht-lytischen Mutante S288C/I371P/V374P wurden die HlyA-Derivate HlyA-S372C und HlyA-V374C konstruiert. Das Fluoreszenzmaximum von Badan verschob sich bei diesen Toxinderivaten um etwa -11 bzw. etwa -17 nm bei der Bindung an Erythrozytenmembranen (Ghosts), und um etwa 4 bzw. 7 nm bei der Membranlyse (Abb. 3-18). Diese Ergebnisse sprechen für eine Membraninsertion der Aminosäuren. Weiterhin wurden die Toxinderivate S383C und A384C hergestellt und auf Membraninteraktion untersucht. Obwohl die Aminosäure an Position 380 in Membranen inseriert (Schindel et al., 2001), konnte dies für die beiden Aminosäuren 383 und 384 nicht bestätigt werden. Es kam durch die Interaktion des Toxins mit Membranen zu keiner signifikanten Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von Badan (Abb. 3-18, siehe auch Abb. 3-13), d.h. die Aminosäuren sind nicht an der direkten Membraninteraktion beteiligt. Für die membraninteragierende und putativ porenbildende α -helicale Sequenz, in der auch die Aminosäuren 372 und 374 liegen, bedeutet dies, dass sie maximal bis zu Aminosäure 282 reicht.

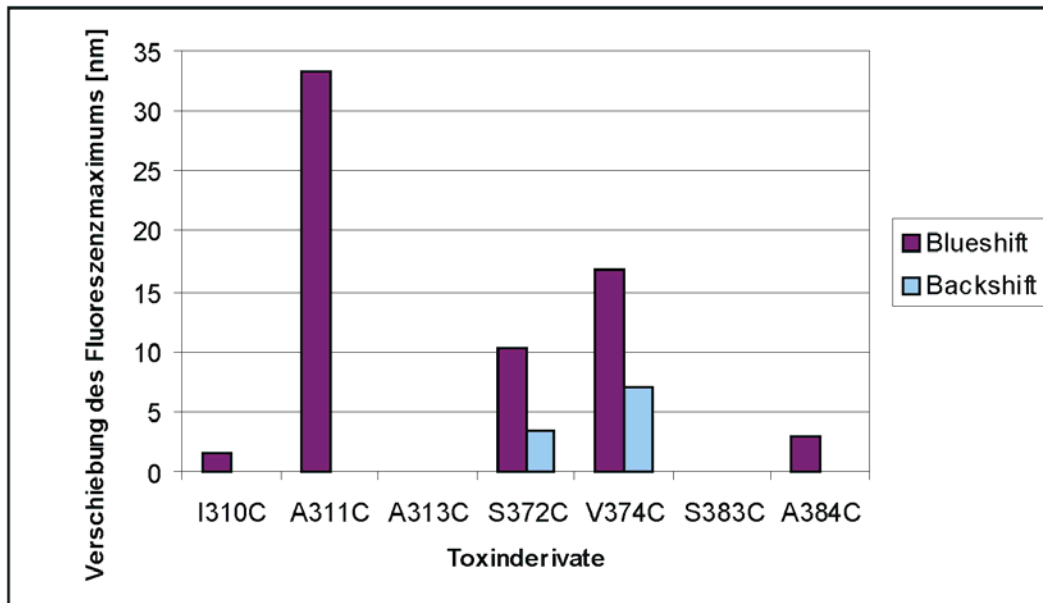


Abb. 3-18: Verschiebung des Badan-Fluoreszenzmaximums bei Cysteinsubstituierten HlyA-Derivaten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Messungen.

4. Diskussion

Porenbildende Toxine werden in wasserlöslicher Form von ihrem Produzenten sekretiert, binden an Zielmembranen, und inserieren in einer amphipathischen Struktur, die eine hydrophile Pore bildet. Bei allen porenbildenden Toxinen, für die der Mechanismus der Porenbildung bislang aufgeklärt wurde, beinhaltet der Prozess der Porenbildung eine Oligomerisierung oder Multimerisierung (Wilmsen et al., 1992; Olofsson et al., 1993; Gouaux et al., 1994; Sliwinski-Korell, 1999; Walev et al., 2001; Kristan et al., 2004; Iacovache et al., 2006). Bei β -PFTs wird die porenbildende Struktur durch Insertion einer β -Haarnadelstruktur aus jedem Protomer gebildet (Valeva et al., 1996; Valeva et al., 2005), während α -PFTs ihre Pore durch Insertion einer oder mehrerer α -Helices bilden (Ludwig et al., 1991; Kristan et al., 2004; Basler et al., 2005; Valeva et al., 2008).

4.1 Der Prozess der Porenbildung durch α -Hämolyisin beinhaltet keine Oligomerisierung

Der porenbildende Mechanismus von RTX-Toxinen, zu denen auch das α -Hämolyisin von *Escherichia coli* gehört, ist bislang nicht gut untersucht, und über die Struktur ist wenig bekannt. Nach Lally et al. (1999) erfolgt nach der Bindung des Toxins an die Zielmembran die Insertion der porenbildenden Struktur möglicherweise durch eine Konformationsänderung in eine nicht-native, intermediäre Form, die so genannte Molten Globule Form (Lally et al., 1999). Die Frage einer möglichen Dimerisierung oder Oligomerisierung im Verlauf der Porenbildung ist jedoch für RTX-Toxine noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen zu einem Prototypen der RTX-Toxine, dem *Bordetella pertussis* Adenylat Cyclase Toxin, weisen allerdings auf eine lytisch aktive dimere oder oligomere Form dieses Toxins hin (Iwaki et al., 1995; Lee et al., 2005).

Zum porenbildenden Mechanismus von HlyA existieren unterschiedliche Postulate. Einige Studien deuten auf eine durch ein Monomer gebildete Pore hin (Bhakdi et al., 1986; Menestrina et al., 1987; Menestrina, 1988), andere auf die Oligomerisierung des Toxins (Benz et al., 1989; Ludwig et al., 1993). Bhakdi et al. (1986) konnten ausschließlich die monomere Form des Toxins auf Erythrozyten nachweisen, jedoch keine Dimere oder Oligomere. Das membrangebundene Toxin wurde nach der Porenbildung durch SDS-Gelelektrophorese analysiert und im Westernblot nachgewiesen. Durch den Einsatz von Crosslinkern und durch die Methode der Coimmunpräzipitation in der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehung möglicher Oligomere während der Porenbildung auf verschiedenen Membranen weitestgehend ausgeschlossen, und somit das Ergebnis von Bhakdi et al. (1986) bestätigt. Im Falle von Protein-Interaktionen, wie sie auch eine Dimerisierung oder Oligomerisierung darstellt, kommt es durch den Einsatz von Crosslinkern zur irreversiblen, SDS-stabilen Vernetzung der interagierenden Proteinmoleküle, die durch SDS-PAGE und

Westernblot detektierbar sind (Sliwinski-Korell, 1999; Ramjeesingh et al., 2001; Zeng et al., 2006). Bei der Coimmunpräzipitation handelt es sich ebenfalls um eine etablierte Methode zum Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen (Taylor et al., 2001; Lee et al., 2005). Mit beiden Methoden konnten für HlyA keine Oligomere nachgewiesen werden. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es möglicherweise zur Bildung geringer Mengen von lytisch aktiven Oligomeren kommen könnte, deren Konzentration aber unterhalb der Nachweisgrenze der im Westernblot eingesetzten Antikörper liegt.

Menestrina et al. (1987) postulierten die monomere Porenbildung von HlyA anhand der linearen Abhängigkeit der Ionenleitfähigkeit von der Toxinkonzentration. Auch der Ablauf des Permeabilisierungsprozesses calceingefüllter Lipidvesikel durch α -Hämolyisin wurde als eine Art „Reaktion pseudo-erster Ordnung“ gedeutet, die auf die Bildung der Pore durch ein Monomer hinweist (Menestrina, 1988). Auf der anderen Seite gibt es einige Publikationen, in denen eine Oligomerisierung des Toxins favorisiert wurde. Benz et al. (1989) widerlegten die von Menestrina et al. (1987) beschriebene konzentrationsabhängige Ionenleitfähigkeit von Lipidvesikeln durch α -Hämolyisin; in ihrer Studie publizierten sie vielmehr einen Anstieg der Ionenleitfähigkeit in Abhängigkeit von der Toxinkonzentration, der auf eine Oligomerisierung des Toxins hinweist. Auch Ergebnisse von Ludwig et al. (1993) mit verschiedenen, ausschließlich nicht-lytischen HlyA-Derivaten, deren Coexpression zur Rekonstruktion der hämolytischen Aktivität führte, wurden als Beweis der Oligomerisierung von *E. coli* α -Hämolyisin aufgeführt. Bei oligomerisierenden porenbildenden Toxinen wird bei gemeinsamer Inkubation zweier unterschiedlicher Derivate des entsprechenden Toxins die Bildung von Heterooligomeren erwartet, die aus beiden Derivaten bestehen. Beim Einsatz lytischen und nicht-lytischen Toxins wirkt sich das nicht-lytische Toxin in der Regel auf die porenbildende Aktivität des lytischen Toxins aus. Eine veränderte hämolytische Aktivität in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis lytischen und nicht-lytischen Toxins wurde beispielsweise für das *Staphylococcus aureus* α -Toxins nachgewiesen, das als Heptamer aktiv ist (Valeva et al., 1997_a), und für das *Bordetella pertussis* Adenylat Cyclase Toxin, für das ein oligomeres Verhalten bereits vor der Bindung an die Zielmembran beschrieben wurde (Lee et al., 2005). Teilweise wurde bei diesem Toxin auch durch die Oligomerisierung zweier nicht-lytischer Toxinderivate mit Mutationen in unterschiedlichen funktionellen Domänen eine Rekonstruktion der cytolytischen Aktivität beobachtet (Iwaki et al., 1995). Im Gegensatz zu anderen porenbildenden Toxinen wurde eine Rekonstruktion der hämolytischen Aktivität von nicht-lytischen HlyA-Derivaten nur im Fall der Coexpression der unterschiedlichen Derivate erreicht, jedoch nicht durch Mischen getrennt exprimierter Proteine (Ludwig et al., 1993); eine Oligomerisierung vor oder während der Sekretion wurde allerdings durch Versuche mit einem Sekretions-defizienten HlyA-Derivat ausgeschlossen.

Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse ihrer Versuche postulierten die Autoren damals die Oligomerisierung des *Escherichia coli* α -Hämolytins.

In der vorliegenden Arbeit wurde lytisch aktives HlyA mit unterschiedlichen ausschließlich nicht-lytischen HlyA-Derivaten gemischt, ohne dass ein Einfluss auf die hämolytische Aktivität beobachtet werden konnte. Da HlyA als Monomer sekretiert wird (Ludwig et al., 1993) deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass es, im Vergleich zu anderen bekannten porenbildenden Toxinen, vor oder während der Porenbildung nicht zu Bildung von Oligomeren kommt.

Für einige porenbildende Toxine wurde die rezeptorabhängige Bindung an die Zielzelle im Verlauf der Porenbildung nachgewiesen. *Staphylococcus aureus* α -Toxin bindet z. B. mit großer Wahrscheinlichkeit an die Kopfgruppen geclusterter Lipide (Valeva et al., 2006), *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O (LLO) und *Streptococcus intermedius* Intermedilysin (ILY) an CD59, ein GPI-verankertes Molekül (Jacobs et al., 1998; Giddings et al., 2004). Der Vorteil der Rezeptorabhängigkeit porenbildender Toxine könnte in der Zusammenführung und Aufkonzentrierung mehrerer Monomere liegen, durch die eine Multimerisierung ermöglicht und begünstigt wird (Abrami & van der Goot, 1999). Für das *Escherichia coli* α -Hämolytins wurde die Bindung an β_2 -Integrin Rezeptoren bei Leukozyten und an Glycophorin bei Erythrozyten beschrieben (Lally et al., 1997; Cortajarena, 2001). Weitere Untersuchungen zur Bindung an β_2 -Integrin Rezeptoren auf Granulozyten zeigten jedoch, dass Bindung und Porenbildung des Toxins auch ohne diesen Rezeptor erfolgen (Valeva et al., 2005_b). Auch die unabhängige Bindung einzelner exprimierter Domänen des HlyA-Moleküls an Liposomen sprechen gegen die rezeptorabhängige Bindung (Hyland et al., 2001), ebenso wie die mehrfach demonstrierte Porenbildung durch HlyA in proteinfreien, künstlichen Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung (Menestrina et al., 1987; Ostolaza et al., 1993; Menestrina et al., 1994). Die Rezeptorunabhängigkeit könnte somit ebenfalls einen möglichen Hinweis auf eine von einer Oligomerisierung unabhängige Porenbildung darstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Bildung der Pore unabhängig von der Etablierung langlebiger Oligomere erfolgt. Durch diese Arbeit konnte das Postulat von Bhakdi et al. (1986) und Menestrina et al. (1987 und 1988) bestätigt werden, dass HlyA mit größter Wahrscheinlichkeit als Monomer lytisch aktiv ist. Es handelt sich somit bei HlyA um das erste bakterielle porenbildende Toxin, bei dessen Porenbildung in eukaryontischen Zellmembranen keine Notwendigkeit zur Oligomerisierung besteht. Im Gegensatz zu allen anderen bisher auf die Porenbildung untersuchten porenbildenden

Toxinen reicht bei HlyA ein einzelnes Toxinmolekül aus, um eine funktionelle Pore in der Zielmembran zu bilden.

Die vorliegende Studie schließt weiterhin aus, dass die Funktion der für die Porenbildung essentiellen Fettsäurereste an den Lysinen 564 und 690, die bislang ungeklärt ist und zu der lediglich spekulative Thesen aufgestellt wurden (Stanley et al., 1998), in der Wechselwirkung zwischen mehreren Toxinmolekülen liegt.

4.2 Charakterisierung des N-Terminus von *Escherichia coli* α -Hämolysin

Das *Escherichia coli* α -Hämolysin besteht aus einer N-terminalen Hälfte, in der hydrophobe α -Helices dominieren, und der C-terminalen Hälfte mit Modifikationsdomäne, calciumbindenden RTX-Repeats und Sekretionssignal, die überwiegend eine β -Faltblattstruktur aufweist. Die N-terminale Hälfte des Proteins wird mit der Bildung der Pore in Verbindung gebracht, und die Aminosäuresequenz 178 bis 410 wurde als membraninteragierende und porenbildende Struktur beschrieben (Ludwig et al., 1991). Die genaue Funktion der N-terminalen Aminosäuren vor dieser Sequenz ist dagegen bislang ungeklärt.

4.2.1 Die Aminosäuresequenz 1 bis 55 ist nicht essentiell für die Porenbildung, interagiert aber mit der Zielmembran

Ludwig et al. (1991) postulierten eine amphipatisch α -helicale Struktur des N-Terminus von HlyA. Viele porenbildende Toxine weisen amphipathische Sequenzen auf, die als porenbildende Struktur in die Membran der Zielzelle inserieren; häufig handelt es sich hierbei um β -Faltblattstrukturen, bei denen hydrophobe und hydrophile Aminosäuren alternieren, wie z.B. beim *Staphylococcus aureus* α -Toxin (Valeva et al., 1996). Es wurden jedoch, u. a. bei HlyA, auch membranspannende α -Helices mit amphipathischer Struktur identifiziert (Slotboom et al., 2001; White et al., 2006; Valeva et al., 2008); eine etablierte Methode zur Identifikation amphipathischer membraninserierender Domänen ist die Cysteinsubstitution und anschließende cysteinspezifische Markierung mit umgebungssensitiven Fluorophoren und fluoreszenzspektrometrischer Analyse.

Trotz der putativ amphipathischen, α -helicalen Struktur der etwa 40 N-terminalen Aminosäuren von HlyA, die eine Sequenz als porenbildenden Struktur prädestiniert, wurde schon in frühen Studien gezeigt, dass dieser Bereich nicht an der Porenbildung beteiligt ist (Ludwig et al., 1991); vielmehr führten Deletionen innerhalb dieser Sequenz zur Bildung größerer, länger geöffneter Poren in Asolectinmembranen, und einer gesteigerten lytischen Aktivität auf Erythrozyten. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten in der vorliegenden Arbeit weder deutliche Veränderungen der lytischen Aktivität auf Kaninchenerythrozyten und

humanen Keratinozyten, noch eine Veränderung der Porengröße bei Toxinderivaten mit Deletionen im Bereich der 50 N-terminalen Aminosäuren festgestellt werden. Die Beteiligung an der porenbildenden Struktur wurde aufgrund der unveränderten Aktivität ausgeschlossen. Porenbildende α -Helices weisen eine amphipathische Struktur auf, bei der ein Teil der Aminosäuren in der hydrophoben Membran verankert ist, während die übrigen Aminosäuren das Lumen der Pore begrenzen und somit in einer hydrophilen Umgebung lokalisiert sind (White et al., 2006; Valeva et al., 2008). Im Gegensatz zur porenbildenden Sequenz 272 bis 298 (Valeva et al., 2008) wurde innerhalb der membraninserterenden N-terminalen Sequenz 13 bis 55 kein periodisches Muster in Bezug auf die Membraninsertion der Aminosäuren nachgewiesen, das auf eine amphipathische α -Helix hinweisen würde. Zusätzliche Untersuchungen mit monoacylierten und nicht-acylierten Toxinderivaten zeigten darüber hinaus, dass die Membraninsertion des N-Terminus unabhängig von der Modifikation des Toxins durch Fettsäureacylierung der Lysine 564 und 690 erfolgt.

Die Fettsäureacylierung des Lysins 690 ist essentiell für die lytische Aktivität von HlyA; die Modifikation des Lysins 564 ist ebenfalls bedeutend für die Porenbildung, ohne diese Modifikation wird die lytische Aktivität des Toxins stark vermindert (Stanley et al., 1994; Pellett & Welch, 1996). Über die Wechselwirkungen der Fettsäurereste, die zur Porenbildung beitragen, ist bisher nichts bekannt. Mögliche Funktionen sind die Bindung an oder die Insertion in die Membran der Zielzelle, oder intramolekulare Interaktionen mit anderen Bereichen des Toxins (Stanley et al., 1998). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können Wechselwirkungen der Fettsäurereste mit der N-terminalen Sequenz ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass der N-Terminus sowohl lytischen als auch nicht-lytischen α -Hämolytins in die Membran inseriert. Eine eigenständige irreversible Insertion des N-Terminus unabhängig von anderen Bereichen des Toxins kann aufgrund früherer Studien ausgeschlossen werden: Untersuchungen verschiedener HlyA-Peptide hatten gezeigt, dass ein Peptid, bestehend aus N-Terminus und porenbildenden Domänen (Aminosäuren 1 bis 520), sowohl an Liposomen band als auch irreversibel inserierte (Hyland et al., 2001), während N-terminale Peptide, bestehend aus den Aminosäuren 1 bis 255 und 1 bis 315, nur zu 5-10 % an Liposomen gebunden vorlagen. Diese Publikation verdeutlicht, dass der N-Terminus von HlyA eigenständig nicht oder nur sehr eingeschränkt irreversibel an Lipidmembranen bindet. Möglich wäre aber eine eigenständige, reversible Insertion des N-Terminus.

Bei HlyA werden drei Arten der Interaktion mit Membranen unterschieden: die reversible Adsorption, die irreversible nicht-lytische Insertion und die Porenbildung (Bauer & Welch, 1996, Bakás et al., 1996, Sánchez-Magraner et al., 2006), wobei letztere abhängig von Calciumbindung und Fettsäureacylierung des Toxins ist (Boehm et al., 1990; Döbereiner et

al., 1996; Bauer & Welch, 1996; Goni & Ostalaza, 1998; Schindel et al., 2001; Valeva et al., 2005_b; Sánchez-Magraner et al., 2007); die Bindung der Calciumionen muss für eine lytische Aktivität bereits vor der Bindung des Toxins an die Membran erfolgen (Ostolaza & Goni, 1995). Ob das Toxin reversibel bindet oder irreversibel inseriert ist primär abhängig von Membranzusammensetzung und -zustand: fluide Membranen fördern die Insertion des Toxins (Bákas et al., 1996). Möglicherweise handelt es sich bei der Adsorption um eine initiale Interaktion mit der Membran, die eine spätere Insertion und Porenbildung erleichtert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der N-Terminus, obschon nicht essentiell für die Insertion, sowohl in nicht-lytischem als auch in lytischem Toxin mit der Zielmembran interagiert. Die putative Funktion des N-Terminus könnte in einer initialen Adsorption an die Membran bestehen, die eine spätere Insertion des Toxins begünstigt; eine bedeutende Rolle könnte diese Funktion bei der Interaktion mit Zellmembranen haben, deren Zustand oder Zusammensetzung die Insertion des Toxins hemmen.

4.2.2 Die Deletion der 100 N-terminalen Aminosäuren führt zu einer starken Beeinträchtigung der lytischen Aktivität von HlyA

Die Deletion der N-terminalen Aminosäuresequenz 1 bis 100 beeinträchtigte die lytische Aktivität von HlyA um den Faktor 35; die Sequenz 56 bis 100 ist jedoch weder an der Bindung des Toxins an die Zielmembran beteiligt, obwohl die Aminosäuren 1 bis 55 in die Membran inserieren, noch bildet sie einen Teil der porenbildenden Struktur. Bereits frühere Studien hatten darauf hingedeutet, dass dieser Bereich des Toxins nicht essentiell für die Bindung an Membranen ist (Bauer & Welch, 1996; Hyland et al., 2001), und, im Gegensatz zu dem analogen Bereich des RTX-Toxins Leukotoxin von *Pasteurella haemolytica*, keine toxinspezifische Bedeutung für die lytische Aktivität aufweist (Forestier & Welch, 1991); durch den Austausch der N-terminalen Aminosäuresequenz 1 bis 169 von HlyA gegen die entsprechende Sequenz des Leukotoxins wurde die lytische Aktivität von HlyA nicht bedeutend verändert. Die Funktion eines Proteins ist stärker mit der dreidimensionalen Struktur als mit der per se Primärstruktur verknüpft, weshalb die Tertiärstruktur in der Evolution stärker konserviert wurde als die Aminosäuresequenz. Der starke Funktionsverlust von HlyA durch die Deletion der 100 N-terminalen Aminosäuren bei weitestgehend unveränderter Aktivität nach Austausch des N-Terminus gegen die nicht-homologe Sequenz von Leukotoxin könnten somit ein Hinweis auf eine strukturelle Funktion der Sequenz für die lytisch aktive Konformation von HlyA sein. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung einer Toxinmutante mit Deletion der Aminosäuren 50 bis 100; diese könnte zeigen, ob die Bedeutung der Aminosäuren 50 bis 100 unabhängig von der Deletion der ersten 50 Aminosäuren ist, die, wie oben beschrieben, keinen Einfluss auf die lytische Aktivität hat.

Wie bereits erwähnt, ist die Porenbildung abhängig von Calciumbindung und Modifikation des Toxins. Durch die Calciumbindung wird die β -Faltblatt-Struktur der RTX-Domäne stabilisiert, und die Struktur wird kompakter; diese Veränderung der Struktur wirkt sich auf die Konformation der hydrophoben N-terminalen Hälfte des Toxins aus, und ermöglicht dadurch die Bildung der Pore (Ostolaza et al., 1995; Bákas et al., 1996; Goñi & Ostolaza, 1998; Sánchez-Magraner et al., 2007). Studien von Schindel et al. (2001) hatten am Beispiel der Aminosäure 67 durch Cysteinsubstitution und fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen gezeigt, dass auch dieser Bereich von HlyA nach der Bindung von Calcium konformationelle Veränderungen durchläuft. Die Tertiärstruktur von Proteinen ist neben der Ausbildung von Disulfidbrücken, die jedoch in HlyA durch die fehlenden Cysteine nicht auftreten, in hohem Maße abhängig von intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Bereichen des Proteins. Somit könnte die Funktion der Sequenz 56 bis 100 in einer Beteiligung an der lytisch aktiven Tertiärstruktur des Hämolytins durch hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Bereichen des Toxins liegen. Eine interessante Möglichkeit ist in diesem Zusammenhang auch eine Art von Wechselwirkung mit den Fettsäureresten der modifizierten Lysine, deren genaue Funktion bisher nicht geklärt werden konnte (Stanley et al., 1998). Bekannt ist aber, dass die Modifikation des Lysins 690 essentiell für die lytische Aktivität ist, während eine Verhinderung der Fettsäureacylierung an Lysin 564 zu einer stark verminderten Aktivität führt (Stanley et al., 1994; Pellett & Welch, 1996); diese Ergebnisse scheinen sich mit dem Resultat der Deletion der Aminosäuresequenz 1 bis 100 zu ergänzen, und weitere Untersuchungen zu einer möglichen Wechselwirkung zwischen Fettsäureresten und der Sequenz 56 bis 100 sind von größtem Interesse.

4.3 Identifizierung putativ porenbildender α -Helices

Bemühungen zur Aufklärung der Struktur von HlyA gestalten sich aufgrund der Größe des Proteins, der Modifikation durch Fettsäureacylierung und der starken Tendenz zur Bildung von Aggregaten als schwierig. Kristallographische Analysen, wie sie für andere porenbildende Toxine existieren (Song et al., 1996; Wiener et al., 1997; Olson et al., 1999; Olson & Guoaux, 2005), liegen daher bislang weder für HlyA noch für andere zur Familie der RTX-Proteine gehörenden Toxine vor.

Ein Ansatz zur Identifikation putativer Helices basiert auf der Prolinsubstitution innerhalb der putativ α -helicalen Sequenz, sowie auf spektrofluorometrischen Analysen cysteinsubstituierter Toxinderivate, die cysteinspezifisch mit umgebungssensitiven Fluorophoren markiert werden; letztere dienen der Charakterisierung membraninserter Sequenzen, und wurden bereits für HlyA und verschiedene andere Proteine, u. a. weitere porenbildende Toxine, angewendet (Ward et al., 1994; Palmer et al., 1996; Slotboom et al.,

2001; Nassi et al., 2002; Valeva et al., 2005_a; Valeva et al., 2008). Im Gegensatz zu vielen anderen bekannten Toxinen, die ihre Poren durch Oligomerisierung und Insertion amphipathischer β -Faltblätter bilden, bildet HlyA eine monomere Pore (diese Arbeit) durch Insertion α -helicaler Domänen (Ludwig et al., 1991; Valeva et al., 2008). Die Aminosäuren 272 bis 298 wurden in früheren Studien als amphipathische, porenbildende Sequenz identifiziert (Valeva et al., 2008), und der Befund, dass HlyA als Monomer aktiv ist, verlangt zwingend nach weiteren porenbildenden Regionen innerhalb der Aminosäuresequenz.

Durch die Charakterisierung putativ porenbildender Domänen durch doppelprolin- und cysteinsubstituierte HlyA-Derivate konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ergebnisse erzielt werden:

- A) Aminosäuresubstitutionen A333P/I336P, A397P/G400P, S413P/A416P und I484P/L487P resultierten in eingeschränkt lytischem Toxin. Diese Bereiche besitzen eine α -helicale Struktur, die für die Porenbildung von Bedeutung und möglicherweise essentiell sind.
- B) Die Aminosäuresubstitutionen I310P/A313P, I371P/V374P und A447P/A450P resultierten in nicht-lytischem Toxin. Diese α -helicalen Bereiche sind für die Porenbildung essentiell.
- C) Die Aminosäuresubstitution A447P/A450P verhindert die Membraninsertion der porenbildenden Region 278-298.
- D) Die Aminosäuresubstitutionen L139P/A142P, I188P/L190P, S214P/S217P, G224P/N227P, S352P/A355P und S499P/S502P hatten keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität von HlyA.

Zu A und B) Sieben der im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten doppelprolinsubstituierten HlyA-Derivate wiesen eine stark reduzierte oder vollständig verhinderte Aktivität der hämolytischen Aktivität ohne signifikante Reduktion der Bindung an Membranen auf, ein Hinweis auf die α -helicale Struktur mit Bedeutung für die Porenbildung. Die Veränderung membraninserierender α -helicaler Strukturen durch Einführung von ein bis zwei Prolinen reduziert oder verhindert die Membraninsertion (Caputo & London, 2003). In früheren Studien zu HlyA konnte gezeigt werden, dass die Einführung zweier Proline in den Bereich der porenbildenden Region 272 bis 298 zu einer nicht-lytischen Form von α -Hämolysin führte (Valeva et al., 2008); die Einführung von Prolinen in eine nicht-membraninserierende putative α -Helix hatte dagegen keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität des Toxins. Auch das dem HlyA homologe Adenylat Cyclase Toxin (CyA) von *Bordetella pertussis*, das ebenfalls zu der RTX-Toxin Familie gehört, zeigte bei Einführung einzelner Proline in die vorhergesagten Transmembransegmente 502 bis 522 und 565 bis 591 eine stark reduzierte hämolytische Aktivität, und eine Verminderung der Translokation des Adenylat Cyclase Domäne über die Zellmembran, die durch die gebildete Pore erfolgt

(Basler et al., 2007). Neben diesen beiden Transmembrandomänen wurden durch Prolinsubstitutionen drei weitere putative α -Helices mit Bedeutung für die Porenbildung charakterisiert, bei denen die Proline als Helixbrecher die hämolytische Aktivität stark reduzierten (Powthongchin & Angsuthanasombat, 2008).

Ludwig et al. (1991) postulierten durch Vorhersagen zur Konformation von HlyA anhand der Aminosäuresequenz acht α -Helices im Bereich der Aminosäuren 178 bis 410 von *Escherichia coli* HlyA. Deletionen der Aminosäuren 238 bis 289, 300 bis 319 und 366 bis 410 resultierten in nicht-lytischem Toxin, und wurden daher als hydrophobe, porenbildende Regionen (Domäne I, II und III) interpretiert. Diese Domänen umfassen fünf putative α -Helices. Die Domänen II und III von Ludwig et al. (1991) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die prolinsubstituierten, nicht-lytischen Toxinderivate 310P/313P und 371P/374P bestätigt, allerdings konnten für den Aminosäurebereich 310 bis 313 Membraninsertionen und somit die Beteiligung an der porenbildenden Struktur bereits ausgeschlossen werden. Diese α -helicale Domäne ist vermutlich ein wichtiger struktureller Bestandteil für die porenbildende Tertiärstruktur des Toxins, ohne direkt in die Pore involviert zu sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es sich um einen nicht-membraninserterenden Teil der Pore handelt, und es durch die Prolinsubstitution und die Veränderung der α -helicalen Struktur zur Schließung der Pore kommen.

Für Aminosäuren 372 und 374, die in der von Ludwig et al. postulierten Domäne III liegen und Bestandteil einer essentiellen α -Helix sind, konnte dagegen die Insertion in Membranen nachgewiesen werden; hier müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um aufzuklären, ob diese Domäne einen Teil der Pore bildet. Untersuchungen von Schindel et al. (2001) legen die Vermutung nahe, dass der membraninserierende Bereich sich ungefähr bis zur Aminosäure 380 erstreckt, da diese Aminosäure in die Membran inseriert. Die nachfolgenden Aminosäuren 383 und 384 dagegen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, inserieren nicht in Membranen.

Die porenbildende Funktion der Aminosäuren 272 bis 298, die innerhalb der Domäne I von Ludwig et al. (1991) liegt, wurde bereits in früheren Arbeiten durch prolin- und cysteinsubstituierte Toxinderivate und Membraninteraktionsstudien bestätigt (Valeva et al., 2008).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate durch Doppelprolinsubstitutionen bestätigten zusätzlich zu den bereits erwähnten bedeutenden α -Helices die Bedeutung von vier weiteren Domänen innerhalb der Aminosäuresequenz 272 bis 490, bei denen die Veränderung der α -helicalen Struktur durch Doppelprolinsubstitution zur Einschränkung der hämolytischen Toxinaktivität führte. Diese putativen α -Helices sind demnach ebenfalls bedeutend für die Porenbildung. Unklar ist bislang, ob diese Bereiche eine wichtige Rolle für die Konformation des lytisch aktiven Toxins spielen, oder ob sie direkt an der Porenbildung

beteiligt sind. Die Frage lässt sich durch weitere Cysteinsubstitutionen und Untersuchungen zur Membraninteraktion klären.

Zu C) Die Doppelprolinsubstitution 447P/450P, die zu nicht-lytischem Toxin führte, verhinderte die Membraninsertion der in der porenbildenden Region liegenden Aminosäure 288. Hier kommen mehrere Erklärungen in Betracht: 1) Die Aminosäuresubstitution wirkt sich auf die Konformation des Toxins aus, und verhindert dadurch die Insertion der porenbildenden Sequenz 272 bis 298. 2) Es handelt sich bei diesem Bereich ebenfalls um eine porenbildende Region, die mit der ersten porenbildenden Region interagiert, um porenbildend in die Membran zu inserieren. 3) Die Domäne interagiert mit oder stabilisiert die Konformation der Aminosäuren 272 bis 298, wodurch deren Insertion in die Membran ermöglicht wird.

Zu D) Doppelprolinsubstitutionen innerhalb putativer α -Helices im Bereich der Sequenz 100 bis 350 hatten keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität von α -Hämolysin. Diese Resultate sprechen gegen eine Bedeutung der putativ α -helicalen Strukturen für die Porenbildung, und gegen eine Beteiligung an der porenbildenden Struktur. Schindel et al. (2001) wiesen die Membraninsertion der Serine 214 und 250 nach, und in weiterführenden Studien wurden drei weitere membraninserierende Aminosäuren innerhalb der Sequenz 224 bis 263 identifiziert (Valeva et al., 2008); vier nicht-membraninserierende Aminosäuren wurden dagegen innerhalb der Sequenz 171 bis 184 Region des Toxins identifiziert. Hyland et al. (2001) postulierten durch Untersuchungen zu Bindung und Insertion verschiedener HlyA-Peptide eine hydrophobe, membraninteragierende Aminosäuresequenz innerhalb der Aminosäuren 177 bis 411, und in dieser Domäne die amphipatisch α -helicale Sequenz der Aminosäuren 238 bis 410, die prädestiniert für die Porenbildung sind.

Zusammengefasst sprechen die Resultate der vorliegenden und vorheriger Arbeiten dafür, dass die Aminosäuren im Bereich von etwa 100 bis 250 mit Membranen interagieren, sofern sie Teil eines lytischen oder membraninserierenden HlyA-Proteins oder -Peptides sind, ohne an der Porenbildung selber beteiligt zu sein. Bei alleiniger Expression eines N-terminalen Peptides bis hin zur Aminosäure 315 kommt es nur zu einer geringfügigen Bindung an Membranen (Hyland et al., 2001). Die Erklärung hierfür ist entweder eine stark verminderte Bindung durch die fehlende Interaktion anderer Toxindomänen mit der Membran, oder aber dass dieser Aminosäurebereich eine für HlyA postulierte Bindung an Membranen vermittelt, die im Gegensatz zur Insertion des Toxins und der Porenbildung reversibel ist (Bákas et al., 1996, Sánchez-Magraner et al., 2005). Bákas et al. zeigte die reversible Bindung und irreversible Insertion von HlyA an unterschiedliche Liposomen, wobei Lipide in fluiden Phase die irreversible Bindung förderten. Zudem scheinen die Aminosäuren im Bereich 160 bis 255 die Insertion von weiter C-terminal gelegenen Domänen von HlyA zu unterstützen (Hyland et al., 2001). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass es initial zu einer

reversiblen Bindung des Toxins an Membranen kommt, die anschließend durch Insertion in einen irreversiblen Status übergeht, und dass die nicht-porenbildenden, hydrophoben Bereiche von HlyA an dieser initialen Interaktion beteiligt sind.

Verschiedene Studien zur N-terminalen Hälfte von HlyA hatten auf eine hydrophobe, membraninserierende Domäne im Bereich der Aminosäuren 177 bis 411 hingewiesen, innerhalb derer Aminosäuren der Sequenz 238 (bzw. etwa 270, Valeva et al., 2008) bis 411 an der Porenbildung beteiligt sind (Ludwig et al., 1991; Moayeri & Welch, 1997; Hyland et al., 2001; Schindel et al., 2001; Valeva et al., 2008). Die Untersuchungen und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese These und zeigten, dass die putativen α -Helices im Bereich der Aminosäuren 139 bis 240 keine porenbildenden Domänen sind, und die putativ α -helicale Struktur auch keine Bedeutung für die Porenbildung hat. Im Bereich der Aminosäuren 300 bis 490 wurden hingegen sieben α -Helices mit Bedeutung für die Porenbildung identifiziert. Dies bestätigt die Ergebnisse der zuvor erwähnten Publikationen, und beschreibt darüber hinaus erstmals die Bedeutung für die lytische Aktivität und mögliche Beteiligung an der porenbildenden Struktur von Aminosäuren innerhalb der Sequenz 412 bis 490 von HlyA.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pore des *Escherichia coli* α -Hämolytins mit höchster Wahrscheinlichkeit von einem Monomer gebildet wird. Es handelt sich somit um das erste porenbildende Toxin, das die Membranen eukaryontischer Zellen durch Bildung einer aus einem Monomer bestehenden Pore perforiert. Dieser Befund verlangt zwangsläufig nach dem Vorhandensein weiterer porenbildender Regionen innerhalb der HlyA-Sequenz neben der bereits identifizierten α -Helix im Bereich der Aminosäuren 272-298 (Valeva et al., 2008). Durch Doppelprolinsubstitutionen wurden sieben α -Helices im Bereich der Aminosäuren 300 bis 500 identifiziert, die eine Bedeutung für die Porenbildung haben. Für eine dieser Helices konnte die Interaktion mit Membranen ausgeschlossen werden, eine weitere lieferte Hinweise für eine Membraninsertion und möglicherweise direkte Beteiligung an der porenbildenden Struktur selbst. Weitere Cysteinsubstitutionen innerhalb der für die Porenbildung bedeutenden α -helicalen Sequenzen und auf diesen basierende Membraninteraktionsstudien sind von Interesse, um die porenbildenden Domänen innerhalb der HlyA-Sequenz eindeutig zu identifizieren.

Für Aminosäuren innerhalb der Sequenz 13-55 konnte die von der Modifikation des Hämolytins und der Porenbildung unabhängige Membraninsertion aller untersuchten Aminosäuren gezeigt werden. Die direkte Beteiligung an der Porenbildung wurde ausgeschlossen, die Funktion der Sequenz ist weiterhin unklar. Es wurde die These

aufgestellt, dass dieser Proteinbereich eine Rolle bei der reversiblen Bindung von HlyA an Membranen spielt; diese Adsorption tritt insbesondere unter Umständen auf, die eine irreversible Insertion des Toxins in die Membran erschweren oder verhindern. Untersuchungen mit Liposomen unterschiedlicher Membranzusammensetzung und bei geringen Temperaturen, die eine starre Phase der Lipidmembranen fördern und somit die Insertion hemmen, könnten zeigen, ob die 50 N-terminalen Aminosäuren hierbei eine entscheidende Funktion für die Interaktion mit der Membran aufweisen, und ob ein Unterschied zwischen lytischen und nicht-lytischen Toxinderivaten besteht.

Nach Deletion der 100 N-terminalen Aminosäuren wies HlyA eine stark verringerte lytische Aktivität auf, ohne dass sich die Größe der Pore veränderte. Eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Pore selbst wurde daher ausgeschlossen. Da die Deletion der Aminosäuren 1 bis 50 keinen Einfluss auf die hämolytische Aktivität hatte, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Grund für die Verringerung der Aktivität in der Deletion der Aminosäuren innerhalb des Bereiches 51 bis 100 liegt. Diese Annahme könnte mit einer entsprechenden Deletionsmutante untersucht werden. Außerdem könnte ein Toxinderivat mit Doppelprolinsubstitution in der putativen α -Helix innerhalb dieses Bereiches zeigen, ob die Sekundärstruktur für die uneingeschränkte hämolytische Porenbildung von Bedeutung ist. Weiterhin von Interesse sind Untersuchungen zu intramolekularen Wechselwirkungen der Sequenz mit anderen Bereichen des Toxins, insbesondere auch mit den Fettsäureresten der modifizierten Lysine 564 und 690.

Untersuchungen zur Funktion der erwähnten Fettsäurereste sind allgemein von großem Interesse. Als mögliche Funktionen wurden bislang intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Fettsäureresten mehrerer Toxinmoleküle beschrieben, Interaktionen mit der Zielmembran (Bindung und/oder Insertion), sowie intramolekulare Wechselwirkungen mit anderen Domänen des Toxins (Stanley et al., 1998); erstere Möglichkeit konnte durch den Beweis der monomeren Porenbildung in dieser Arbeit bereits ausgeschlossen werden.

Bislang konnte weder in früheren Arbeiten noch im Rahmen dieser Arbeit durch Doppelprolinsubstitutionen in putativ α -helicalen Bereichen innerhalb der Aminosäuren 100 bis etwa 270 deren Funktion für das α -Hämolysin geklärt werden. Bisher lässt sich lediglich sagen, dass die Aminosäuren teilweise in die Membran inserieren, für die lytische Funktion aber eine α -helicale Struktur nicht unbedingt von Bedeutung ist. Der gesamte Proteinbereich oder Teile davon könnten die Bindung des Toxins an Membranen vermitteln oder unterstützen, die Pore stabilisieren, oder an der Ausbildung der lytisch aktiven Struktur des Toxins durch intramolekulare Wechselwirkungen beteiligt sein. Ein erster Ansatz zur Annäherung an die Fragestellung könnten verschiedene Toxinderivate mit Deletionen innerhalb der Aminosäuresequenz 100 bis 270 darstellen.

5. Zusammenfassung

Das *Escherichia coli* α -Hämolysin (HlyA) gehört zur Klasse der α -porenbildenden Toxine, die lytisch durch Insertion und Porenbildung α -helicaler Domänen in Zellmembranen sind. Die N-terminale Hälfte von HlyA besteht aus hydrophoben α -Helices und bildet die Pore, während die C-terminale Hälfte aus Domänen für Modifikation, Calciumbindung und Sekretion besteht und eine β -Faltblattsstruktur aufweist. Die Studien der vorliegenden Arbeit fokussierten sich auf die Frage, ob HlyA als Monomer oder Oligomer lytisch aktiv ist, sowie auf die Funktion des N-Terminus und die Identifizierung putativ porenbildender α -Helices.

- ❖ Im Rahmen dieser Arbeit konnte HlyA als erstes bekanntes porenbildendes Toxin beschrieben werden, bei dem die Pore durch ein Monomer gebildet wird.
- ❖ Im Bereich der Aminosäuren 13 bis 55 inserierten alle auf Membraninteraktionen untersuchten Aminosäuren in die Membran von Kaninchenerythrozyten. Diese Insertion war unabhängig von der Porenbildung und von der Modifikation des Toxins durch Fettsäureacylierung; intramolekulare Wechselwirkung zwischen der Sequenz und den Fettsäuresresten konnten somit ausgeschlossen werden.
- ❖ Die Deletionen der Aminosäuren 20 bis 40 und 1 bis 50 hatte keine Auswirkung auf die lytische Aktivität von HlyA, oder auf die Größe der durch das Toxin gebildeten Poren in Erythrozytenmembranen.
- ❖ Die Deletion der 100 N-terminalen Aminosäuren von HlyA reduzierte die lytische Aktivität des Toxins um den Faktor 35, ohne dass die Größe der Pore einen Unterschied zu einer von Wildtyp-Toxin gebildeten Pore aufwies.
- ❖ Im Bereich der Aminosäuren 300 bis 500 wurden durch Doppelprolinsubstitutionen sieben putative α -Helices identifiziert, die eine Bedeutung für die porenbildende Aktivität von HlyA aufweisen, und möglicherweise direkt an der Struktur der Pore beteiligt sind. Für die innerhalb zwei dieser putativen α -Helices liegenden Aminosäuren 310, 311 und 313 konnte eine Insertion in Membranen ausgeschlossen, für die Aminosäuren 372 und 374 dagegen bestätigt werden.
- ❖ Die Veränderung der putativ α -helicalen Struktur im Bereich der Aminosäuren 476 bis 490 durch Doppelprolinsubstitution verhindert die Membraninsertion der porenbildenden Region 272-298.
- ❖ Für den hydrophoben Bereich von HlyA ab Aminosäure 131 bis 345 wurde mit Hilfe von Doppelprolinsubstitutionen in putativen α -Helices gezeigt, dass putativ α -helicale Strukturen innerhalb dieser Sequenz keine Bedeutung für die porenbildende Aktivität haben.

- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N. G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S. H., Buckley, J. T. and van der Goot, F. G.** 1998 'The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin', *J Biol Chem* 273(49): 32656-61.
- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P. E., Parton, R. G. and van der Goot, F. G.** 1998 'A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum', *J Cell Biol* 140(3): 525-40.
- Andrade, J. R. and Suassuna, I.** 1988 '[Cytotoxic and hemolytic activities in uropathogenic Escherichia coli]', *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83(2): 193-9.
- Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L. and Goni, F. M.** 1996 'Reversible adsorption and nonreversible insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin into lipid bilayers', *Biophys J* 71(4): 1869-76.
- Barnich, N. and Darfeuille-Michaud, A.** 2007 'Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease', *Curr Opin Gastroenterol* 23(1): 16-20.
- Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P. and Osicka, R.** 2007 'Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin', *J Biol Chem* 282(17): 12419-29.
- Bauer, M. E. and Welch, R. A.** 1996 'Association of RTX toxins with erythrocytes', *Infect Immun* 64(11): 4665-72.
- 1997 'Pleiotropic effects of a mutation in rfaC on Escherichia coli hemolysin', *Infect Immun* 65(6): 2218-24.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A.** 1990 'Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase', *Infect Immun* 58(10): 3242-7.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. and Goebel, W.** 1989 'Pore formation by the Escherichia coli hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates', *Infect Immun* 57(3): 887-95.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P.** 1994 'Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli', *J Biol Chem* 269(44): 27231-9.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. and Holland, I. B.** 1986 'Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores', *Infect Immun* 52(1): 63-9.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A. and Hugo, F.** 1989 'Potent leukocidal action of Escherichia coli hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes', *J Exp Med* 169(3): 737-54.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. and Schmidt, G.** 1990 'Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release', *J Clin Invest* 85(6): 1746-53.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** 1979 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Boehm, D. F., Welch, R. A. and Snyder, I. S.** 1990 'Domains of Escherichia coli hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes', *Infect Immun* 58(6): 1959-64.
- Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F. and Sarhan, F.** 2000 'Biotechnological applications of plant freezing associated proteins', *Biotechnol Annu Rev* 6: 59-101.
- Canicatti, C. and Roch, P.** 1993 'Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of Spirographis spallanzani coelomic fluid hemolysin', *Comp Biochem Physiol C* 105(3): 401-7.
- Caputo, G. A. and London, E.** 2003 'Cumulative effects of amino acid substitutions and hydrophobic mismatch upon the transmembrane stability and conformation of hydrophobic alpha-helices', *Biochemistry* 42(11): 3275-85.
- Casadaban, M. J., Chou, J. and Cohen, S. N.** 1980 'In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals', *J Bacteriol* 143(2): 971-80.

- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D.** 2007 'Colicin biology', *Microbiol Mol Biol Rev* 71(1): 158-229.
- Coote, J. G.** 1992 'Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria', *FEMS Microbiol Rev* 8(2): 137-61.
- Cortajarena, A. L., Goni, F. M. and Ostolaza, H.** 2001 'Glycophorin as a receptor for Escherichia coli alpha-hemolysin in erythrocytes', *J Biol Chem* 276(16): 12513-9.
- 2002 'His-859 is an essential residue for the activity and pH dependence of Escherichia coli RTX toxin alpha-hemolysin', *J Biol Chem* 277(26): 23223-9.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J.** 2004 'Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens', *Science* 304(5668): 242-8.
- Duman, J. G., Bennett, V., Sformo, T., Hochstrasser, R. and Barnes, B. M.** 2004 'Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders', *J Insect Physiol* 50(4): 259-66.
- Eberspacher, B., Hugo, F. and Bhakdi, S.** 1989 'Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin', *Infect Immun* 57(3): 983-8.
- Felmlee, T., Pellett, S. and Welch, R. A.** 1985 'Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin', *J Bacteriol* 163(1): 94-105.
- Felmlee, T. and Welch, R. A.** 1988 'Alterations of amino acid repeats in the Escherichia coli hemolysin affect cytolytic activity and secretion', *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 5269-73.
- Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spulakova, V., Konopasek, I. and Sebo, P.** 2007 'Third activity of Bordetella adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities', *J Biol Chem* 282(5): 2808-20.
- Forestier, C. and Welch, R. A.** 1991 'Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes', *Infect Immun* 59(11): 4212-20.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P. and Nunez, G.** 2006 'Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages', *Nat Immunol* 7(6): 576-82.
- Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T. D., Amer, A. and Nunez, G.** 2006 'Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense', *J Immunol* 177(6): 3507-13.
- Gadeberg, O. V. and Orskov, I.** 1984 'In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic Escherichia coli on human blood granulocytes', *Infect Immun* 45(1): 255-60.
- Garnham, C. P., Gilbert, J. A., Hartman, C. P., Campbell, R. L., Laybourn-Parry, J. and Davies, P. L.** 2008 'A Ca²⁺-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold', *Biochem J* 411(1): 171-80.
- Giddings, K. S., Johnson, A. E. and Tweten, R. K.** 2003 'Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins', *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11315-20.
- Giddings, K. S., Zhao, J., Sims, P. J. and Tweten, R. K.** 2004 'Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin', *Nat Struct Mol Biol* 11(12): 1173-8.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. and Ullmann, A.** 1988 'Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein', *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl: 239-52.
- Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Barzu, O. and Danchin, A.** 1989 'Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in Bordetella pertussis adenylate cyclase by site-directed mutagenesis', *Embo J* 8(3): 967-72.
- Goebel, W. and Hedgpeth, J.** 1982 'Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of Escherichia coli', *J Bacteriol* 151(3): 1290-8.
- Goni, F. M. and Ostolaza, H.** 1998 'E. coli alpha-hemolysin: a membrane-active protein toxin', *Braz J Med Biol Res* 31(8): 1019-34.
- Gouaux, J. E., Braha, O., Hobaugh, M. R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C. and Bayley, H.** 1994 'Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore', *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12828-31.
- Graether, S. P. and Sykes, B. D.** 2004 'Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins', *Eur J Biochem* 271(16): 3285-96.

- Gutierrez, M. G., Saka, H. A., Chinen, I., Zoppino, F. C., Yoshimori, T., Bocco, J. L. and Colombo, M. I.** 2007 'Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1829-34.
- Guzman-Verri, C., Garcia, F. and Arvidson, S.** 1997 'Incomplete activation of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) due to mutations in the 3' region of hlyC', *J Bacteriol* 179(18): 5959-62.
- Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I. B. and Schmitt, L.** 2006 'Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB', *FEBS Lett* 580(4): 1036-41.
- Herlax, V., de Alaniz, M. J. and Bakas, L.** 2005 'Role of lipopolysaccharide on the structure and function of alpha-hemolysin from *Escherichia coli*', *Chem Phys Lipids* 135(2): 107-15.
- Holland, I. B., Kenny, B. and Blight, M.** 1990 'Haemolysin secretion from *E coli*', *Biochimie* 72(2-3): 131-41.
- Hoshino, T., Kiriaki, M. and Nakajima, T.** 2003 'Novel thermal hysteresis proteins from low temperature basidiomycete, *Coprinus psychromorbidus*', *Cryo Letters* 24(3): 135-42.
- Howard, S. P. and Buckley, J. T.** 1985 'Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing', *J Bacteriol* 163(1): 336-40.
- Husmann, M., Dersch, K., Bobkiewicz, W., Beckmann, E., Veerachato, G. and Bhakdi, S.** 2006 'Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus* alpha-toxin or streptolysin O', *Biochem Biophys Res Commun* 344(4): 1128-34.
- Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. and Koronakis, V.** 2001 'Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles', *J Bacteriol* 183(18): 5364-70.
- Iacovache, I., Paumard, P., Scheib, H., Lesieur, C., Sakai, N., Matile, S., Parker, M. W. and van der Goot, F. G.** 2006 'A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins', *Embo J* 25(3): 457-66.
- Iacovache, I., van der Goot, F. G. and Pernot, L.** 2008 'Pore formation: an ancient yet complex form of attack', *Biochim Biophys Acta* 1778(7-8): 1611-23.
- Issartel, J. P., Koronakis, V. and Hughes, C.** 1991 'Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation', *Nature* 351(6329): 759-61.
- Iwaki, M., Ullmann, A. and Sebo, P.** 1995 'Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin', *Mol Microbiol* 17(6): 1015-24.
- Jacobs, T., Darji, A., Frahm, N., Rohde, M., Wehland, J., Chakraborty, T. and Weiss, S.** 1998 'Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes', *Mol Microbiol* 28(6): 1081-9.
- Johnson, J. R. and Stamm, W. E.** 1989 'Urinary tract infections in women: diagnosis and treatment', *Ann Intern Med* 111(11): 906-17.
- Johnson, D. E., Lockett, C. V., Russell, R. G., Hebel, J. R., Island, M. D., Stapleton, A., Stamm, W. E. and Warren, J. W.** 1998 'Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice', *Infect Immun* 66(7): 3059-65.
- Kawate, T. and Gouaux, E.** 2003 'Arresting and releasing Staphylococcal alpha-hemolysin at intermediate stages of pore formation by engineered disulfide bonds', *Protein Sci* 12(5): 997-1006.
- Kem, W. R.** 1994 'Structure and membrane actions of a marine worm protein cytolysin, *Cerebratulus* toxin A-III', *Toxicology* 87(1-3): 189-203.
- Koschinski, A., Repp, H., Unver, B., Dreyer, F., Brockmeier, D., Valeva, A., Bhakdi, S. and Walev, I.** 2006 'Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells--the pore is on its own', *Faseb J* 20(7): 973-5.
- Kristan, K., Podlesek, Z., Hojnik, V., Gutierrez-Aguirre, I., Guncar, G., Turk, D., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H., Macek, P. and Anderluh, G.** 2004 'Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich', *J Biol Chem* 279(45): 46509-17.

- Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S. H., Khan, M. S. and Sheerin, N. S.** 2005 'Urinary tract infections: new insights into a common problem', *Postgrad Med J* 81(952): 83-6.
- Laemmli, U. K.** 1970 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature* 227(5259): 680-5.
- Laestadius, A., Richter-Dahlfors, A. and Aperia, A.** 2002 'Dual effects of Escherichia coli alpha-hemolysin on rat renal proximal tubule cells', *Kidney Int* 62(6): 2035-42.
- Lahey, J. H. and Slatin, S. L.** 2001 'Pore-forming colicins and their relatives', *Curr Top Microbiol Immunol* 257: 131-61.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K. and Billings, P. C.** 1997 'RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells', *J Biol Chem* 272(48): 30463-9.
- Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. and Korostoff, J.** 1999 'The interaction between RTX toxins and target cells', *Trends Microbiol* 7(9): 356-61.
- Langston, K. G., Worsham, L. M., Earls, L. and Ernst-Fonberg, M. L.** 2004 'Activation of hemolysin toxin: relationship between two internal protein sites of acylation', *Biochemistry* 43(14): 4338-46.
- Lee, S. J., Gray, M. C., Zu, K. and Hewlett, E. L.** 2005 'Oligomeric behavior of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin in solution', *Arch Biochem Biophys* 438(1): 80-7.
- Lillie, H., Haehnel, W., Rudolph, R. and Baumann, U.** 2000 'Folding of a synthetic parallel beta-roll protein', *FEBS Lett* 470(2): 173-7.
- Lim, K. B., Walker, C. R., Guo, L., Pellett, S., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hewlett, E. L., Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R. and Goebel, W.** 1991 'Mutations affecting pore formation by haemolysin from Escherichia coli', *Mol Gen Genet* 226(1-2): 198-208.
- Ludwig, A., Benz, R. and Goebel, W.** 1993 'Oligomerization of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is involved in pore formation', *Mol Gen Genet* 241(1-2): 89-96.
- Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J. and Goebel, W.** 1996 'Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from Escherichia coli', *J Bacteriol* 178(18): 5422-30.
- Ludwig, A., Vogel, M. and Goebel, W.** 1987 'Mutations affecting activity and transport of haemolysin in Escherichia coli', *Mol Gen Genet* 206(2): 238-45.
- Ludwig, A., Goebel, W., Welch, R. A. and Hackett, M.** 2000 'Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids', *J Biol Chem* 275(47): 36698-702.
- Madden, J. C., Ruiz, N. and Caparon, M.** 2001 'Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria', *Cell* 104(1): 143-52.
- Mancheno, J. M., Tateno, H., Goldstein, I. J., Martinez-Ripoll, M. and Hermoso, J. A.** 2005 'Structural analysis of the Laetiporus sulphureus hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars', *J Biol Chem* 280(17): 17251-9.
- Mansson, L. E., Kjall, P., Pellett, S., Nagy, G., Welch, R. A., Backhed, F., Frisan, T. and Richter-Dahlfors, A.** 2007 'Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic Escherichia coli', *Infect Immun* 75(2): 997-1004.
- Marrs, C. F., Zhang, L. and Foxman, B.** 2005 'Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes?' *FEMS Microbiol Lett* 252(2): 183-90.
- Martin, C., Requero, M. A., Masin, J., Konopasek, I., Goni, F. M., Sebo, P. and Ostolaza, H.** 2004 'Membrane restructuring by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family', *J Bacteriol* 186(12): 3760-5.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J.** 2002 'The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta', *Mol Cell* 10(2): 417-26.
- Martinon, F. and Tschopp, J.** 2005 'NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens', *Trends Immunol* 26(8): 447-54.
- May, A. K., Sawyer, R. G., Gleason, T., Whitworth, A. and Pruett, T. L.** 1996 'In vivo cytokine response to Escherichia coli alpha-hemolysin determined with genetically engineered hemolytic and nonhemolytic E. coli variants', *Infect Immun* 64(6): 2167-71.

- Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. and Bhakdi, S.** 1987 'Escherichia coli haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes', *Biochim Biophys Acta* 905(1): 109-17.
- Menestrina, G.** 1988 'Escherichia coli hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism', *FEBS Lett* 232(1): 217-20.
- Menestrina, G., Bashford, C. L. and Pasternak, C. A.** 1990 'Pore-forming toxins: experiments with S. aureus alpha-toxin, C. perfringens theta-toxin and E. coli haemolysin in lipid bilayers, liposomes and intact cells', *Toxicon* 28(5): 477-91.
- Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S. and Welch, R.** 1994 'Pore-formation by Escherichia coli hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family', *Toxicology* 87(1-3): 249-67.
- Moayeri, M. and Welch, R. A.** 1994 'Effects of temperature, time, and toxin concentration on lesion formation by the Escherichia coli hemolysin', *Infect Immun* 62(10): 4124-34.
- 1997 'Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated Escherichia coli hemolysin', *Infect Immun* 65(6): 2233-9.
- Moniatte, M., van der Goot, F. G., Buckley, J. T., Pattus, F. and van Dorsseleer, A.** 1996 'Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry', *FEBS Lett* 384(3): 269-72.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J. and Sebo, P.** 2008 'RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(14): 5355-60.
- Muller, D., Hughes, C. and Goebel, W.** 1983 'Relationship between plasmid and chromosomal hemolysin determinants of Escherichia coli', *J Bacteriol* 153(2): 846-51.
- Nassi, S., Collier, R. J. and Finkelstein, A.** 2002 'PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel', *Biochemistry* 41(5): 1445-50.
- Nelson, K. L., Raja, S. M. and Buckley, J. T.** 1997 'The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin', *J Biol Chem* 272(18): 12170-4.
- Olofsson, A., Hebert, H. and Thelestam, M.** 1993 'The projection structure of perfringolysin O (Clostridium perfringens theta-toxin)', *FEBS Lett* 319(1-2): 125-7.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y. and Gouaux, E.** 1999 'Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel', *Nat Struct Biol* 6(2): 134-40.
- Olson, R. and Gouaux, E.** 2005 'Crystal structure of the Vibrio cholerae cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore', *J Mol Biol* 350(5): 997-1016.
- Ostolaza, H., Bartolome, B., Ortiz de Zarate, I., de la Cruz, F. and Goni, F. M.** 1993 'Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin', *Biochim Biophys Acta* 1147(1): 81-8.
- Ostolaza, H. and Goni, F. M.** 1995 'Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity', *FEBS Lett* 371(3): 303-6.
- Ostolaza, H., Soloaga, A. and Goni, F. M.** 1995 'The binding of divalent cations to Escherichia coli alpha-haemolysin', *Eur J Biochem* 228(1): 39-44.
- Ostolaza, H., Bakas, L. and Goni, F. M.** 1997 'Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by E. coli alpha-haemolysin', *J Membr Biol* 158(2): 137-45.
- Palmer, M., Saweljew, P., Vulicevic, I., Valeva, A., Kehoe, M. and Bhakdi, S.** 1996 'Membrane-penetrating domain of streptolysin O identified by cysteine scanning mutagenesis', *J Biol Chem* 271(43): 26664-7.
- Parker, M. W., Tucker, A. D., Tsernoglou, D. and Pattus, F.** 1990 'Insights into membrane insertion based on studies of colicins', *Trends Biochem Sci* 15(4): 126-9.
- Pellet, S. and Welch, R. A.** 1996 'Escherichia coli hemolysin mutants with altered target cell specificity', *Infect Immun* 64(8): 3081-7.
- Pimenta, A. L., Racher, K., Jamieson, L., Blight, M. A. and Holland, I. B.** 2005 'Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin', *J Bacteriol* 187(21): 7471-80.

- Powthongchin, B. and Angsuthanasombat, C.** 2008 'Effects on haemolytic activity of single proline substitutions in the Bordetella pertussis CyaA pore-forming fragment', *Arch Microbiol.*
- Ramjeesingh, M., Li, C., Kogan, I., Wang, Y., Huan, L. J. and Bear, C. E.** 2001 'A monomer is the minimum functional unit required for channel and ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator', *Biochemistry* 40(35): 10700-6.
- Randak, C. O. and Welsh, M. J.** 2005 'ADP inhibits function of the ABC transporter cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via its adenylate kinase activity', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 2216-20.
- Ratner, A. J., Hippe, K. R., Aguilar, J. L., Bender, M. H., Nelson, A. L. and Weiser, J. N.** 2006 'Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins', *J Biol Chem* 281(18): 12994-8.
- Rendon, M. A., Saldana, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J. B., Puente, J. L. and Giron, J. A.** 2007 'Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10637-42.
- Rost, B. and Liu, J.** 2003 'The PredictProtein server', *Nucleic Acids Res* 31(13): 3300-4.
- Sanchez-Magraner, L., Cortajarena, A. L., Goni, F. M. and Ostolaza, H.** 2006 'Membrane insertion of Escherichia coli alpha-hemolysin is independent from membrane lysis', *J Biol Chem* 281(9): 5461-7.
- Sanchez-Magraner, L., Viguera, A. R., Garcia-Pacios, M., Garcillan, M. P., Arrondo, J. L., de la Cruz, F., Goni, F. M. and Ostolaza, H.** 2007 'The calcium-binding C-terminal domain of Escherichia coli alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein', *J Biol Chem* 282(16): 11827-35.
- Scherrer, R. and Gerhardt, P.** 1971 'Molecular sieving by the Bacillus megaterium cell wall and protoplast', *J Bacteriol* 107(3): 718-35.
- Schindel, C., Zitzer, A., Schulte, B., Gerhards, A., Stanley, P., Hughes, C., Koronakis, V., Bhakdi, S. and Palmer, M.** 2001 'Interaction of Escherichia coli hemolysin with biological membranes. A study using cysteine scanning mutagenesis', *Eur J Biochem* 268(3): 800-8.
- Scott, A. M. and Saleh, M.** 2007 'The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis', *Cell Death Differ* 14(1): 23-31.
- Sebo, P. and Ladant, D.** 1993 'Repeat sequences in the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the Escherichia coli alpha-haemolysin translocator', *Mol Microbiol* 9(5): 999-1009.
- Sher, D., Fishman, Y., Zhang, M., Lebendiker, M., Gaathon, A., Mancheno, J. M. and Zlotkin, E.** 2005 'Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria', *J Biol Chem* 280(24): 22847-55.
- Shpigel, N. Y., Elazar, S. and Rosenshine, I.** 2008 'Mammary pathogenic Escherichia coli', *Curr Opin Microbiol* 11(1): 60-5.
- Sliwinski-Korell, A., Engelhardt, H., Kampka, M. and Lutz, F.** 1999 'Oligomerization and structural changes of the pore-forming Pseudomonas aeruginosa cytotoxin', *Eur J Biochem* 265(1): 221-30.
- Slotboom, D. J., Konings, W. N. and Lolkema, J. S.** 2001 'Cysteine-scanning mutagenesis reveals a highly amphipathic, pore-lining membrane-spanning helix in the glutamate transporter GltT', *J Biol Chem* 276(14): 10775-81.
- Soderblom, T., Laestadius, A., Oxhamre, C., Aperia, A. and Richter-Dahlfors, A.** 2002 'Toxin-induced calcium oscillations: a novel strategy to affect gene regulation in target cells', *Int J Med Microbiol* 291(6-7): 511-5.
- Soltani, C. E., Hotze, E. M., Johnson, A. E. and Tweten, R. K.** 2007 'Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51): 20226-31.
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. and Gouaux, J. E.** 1996 'Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore', *Science* 274(5294): 1859-66.
- Sousa, M. V., Richardson, M., Fontes, W. and Morhy, L.** 1994 'Homology between the seed cytolysin enterolobin and bacterial aerolysins', *J Protein Chem* 13(8): 659-67.

- Stamm, W. E., Counts, G. W., Running, K. R., Fihn, S., Turck, M. and Holmes, K. K.** 1982 'Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women', *N Engl J Med* 307(8): 463-8.
- Stanley, P., Packman, L. C., Koronakis, V. and Hughes, C.** 1994 'Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin', *Science* 266(5193): 1992-6.
- Stanley, P., Koronakis, V. and Hughes, C.** 1998 'Acylation of Escherichia coli hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function', *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 309-33.
- Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Walev, I. and Schmitt, E.** 2003 'The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways', *Infect Immun* 71(11): 6171-7.
- Stringaris, A. K., Geisenhainer, J., Bergmann, F., Balshusemann, C., Lee, U., Zysk, G., Mitchell, T. J., Keller, B. U., Kuhnt, U., Gerber, J., Spreer, A., Bahr, M., Michel, U. and Nau, R.** 2002 'Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase', *Neurobiol Dis* 11(3): 355-68.
- Sutcliffe, J. G.** 1978 'pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long', *Nucleic Acids Res* 5(8): 2721-8.
- Taylor, J. C., Horvath, A. R., Higgins, C. F. and Begley, G. S.** 2001 'The multidrug resistance P-glycoprotein. Oligomeric state and intramolecular interactions', *J Biol Chem* 276(39): 36075-8.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V.** 1998 'Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore', *Embo J* 17(22): 6487-96.
- Tilley, S. J. and Saibil, H. R.** 2006 'The mechanism of pore formation by bacterial toxins', *Curr Opin Struct Biol* 16(2): 230-6.
- Tweten, R. K.** 2005 'Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins', *Infect Immun* 73(10): 6199-209.
- Uhlen, P., Laestadius, A., Jahnukainen, T., Soderblom, T., Backhed, F., Celsi, G., Brismar, H., Normark, S., Aperia, A. and Richter-Dahlfors, A.** 2000 'Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells', *Nature* 405(6787): 694-7.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S. and Palmer, M.** 1996 'Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin', *Embo J* 15(8): 1857-64.
- Valeva, A., Palmer, M. and Bhakdi, S.** 1997 'Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages', *Biochemistry* 36(43): 13298-304.
- Valeva, A., Pongs, J., Bhakdi, S. and Palmer, M.** 1997 'Staphylococcal alpha-toxin: the role of the N-terminus in formation of the heptameric pore -- a fluorescence study', *Biochim Biophys Acta* 1325(2): 281-6.
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S. and Zitzer, A.** 2004 'A cellular metalloproteinase activates Vibrio cholerae pro-cytolysin', *J Biol Chem* 279(24): 25143-8.
- Valeva, A., Walev, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Heinz, N., Hedderich, J., Lautwein, S., Mocking, M., Weis, S., Zitzer, A. and Bhakdi, S.** 2005 'Identification of the membrane penetrating domain of Vibrio cholerae cytolysin as a beta-barrel structure', *Mol Microbiol* 57(1): 124-31.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T. M., Chavakis, T. and Bhakdi, S.** 2005 'Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent', *J Biol Chem* 280(44): 36657-63.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H. and Bhakdi, S.** 2006 'Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore', *J Biol Chem* 281(36): 26014-21.

- Valeva, A., Siegel, I., Wylenzek, M., Wassenaar, T. M., Weis, S., Heinz, N., Schmitt, R., Fischer, C., Reinartz, R., Bhakdi, S. and Walev, I.** 2008 'Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation', *Biol Chem* 389(9): 1201-7.
- van der Goot, F. G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C. M., Sorokine, O., Van Dorsseleer, A. and Buckley, J. T.** 1992 'Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation', *Biochemistry* 31(36): 8566-70.
- Walev, I., Palmer, M., Valeva, A., Weller, U. and Bhakdi, S.** 1995 'Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers', *Infect Immun* 63(4): 1188-94.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. and Bhakdi, S.** 1995 'Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes', *Embo J* 14(8): 1607-14.
- Walev, I., Bhakdi, S. C., Hofmann, F., Djonder, N., Valeva, A., Aktories, K. and Bhakdi, S.** 2001 'Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O', *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3185-90.
- Walev, I., Hombach, M., Bobkiewicz, W., Fenske, D., Bhakdi, S. and Husmann, M.** 2002 'Resealing of large transmembrane pores produced by streptolysin O in nucleated cells is accompanied by NF-kappaB activation and downstream events', *Faseb J* 16(2): 237-9.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P.** 1990 'ToIC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion', *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12): 4776-80.
- Ward, R. J., Palmer, M., Leonard, K. and Bhakdi, S.** 1994 'Identification of a putative membrane-inserted segment in the alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*', *Biochemistry* 33(23): 7477-84.
- Welch, R. A., Hull, R. and Falkow, S.** 1983 'Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*', *Infect Immun* 42(1): 178-86.
- Welch, R. A. and Pellett, S.** 1988 'Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes', *J Bacteriol* 170(4): 1622-30.
- Welch, R. A.** 2001 'RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology', *Curr Top Microbiol Immunol* 257: 85-111.
- White, D., Musse, A. A., Wang, J., London, E. and Merrill, A. R.** 2006 'Toward elucidating the membrane topology of helix two of the colicin E1 channel domain', *J Biol Chem* 281(43): 32375-84.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. and Stroud, R. M.** 1997 'Crystal structure of colicin Ia', *Nature* 385(6615): 461-4.
- Wilmsen, H. U., Leonard, K. R., Tichelaar, W., Buckley, J. T. and Pattus, F.** 1992 'The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer', *Embo J* 11(7): 2457-63.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Oswald, C., Jumpertz, T., Holland, I. B. and Schmitt, L.** 2005 'A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB', *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 990-5.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I. B. and Schmitt, L.** 2005 'Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter', *Biochemistry* 44(28): 9680-90.
- Zeng, P. Y., Vakoc, C. R., Chen, Z. C., Blobel, G. A. and Berger, S. L.** 2006 'In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation', *Biotechniques* 41(6): 694, 696, 698.
- Zhang, F., Greig, D. I. and Ling, V.** 1993 'Functional replacement of the hemolysin A transport signal by a different primary sequence', *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9): 4211-5.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.dest	Aqua destilliert
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintri-phosphat
Badan	6-bromoacetyl-2-dimethylaminonaphtalene
Br.	Bremse
bzw.	beziehungsweise
CM	Chloramphenicol
d.h.	das heißt
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DMA	Dimethyl adipimidate · HCl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuklease
DSS	Disuccinimidyl suberate
DTT	Dithiotreit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGS	Ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate)
h	Stunde
HA	Influenza Hämagglutinin Protein
HA-Tag	Epitop-Tag des Influenza Hämagglutinin Protein
HBSS	Hank's balanced salt without phenol red
LB	Luria-Bertani Bouillon
M	Molar
min	Minute
OD	optische Dichte
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PFT	Poreforming toxin
PC	L- α -Phosphatidylcholine
PS	3- <i>sn</i> -Phosphatidyl-L-serine
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
RTX	Repeat in toxin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
s. o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
ÜN	über Nacht
V	Volumen
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Die Abkürzung physikalischer Größen, chemischer Elemente, Nukleotide und Aminosäuren erfolgte nach den üblich geltenden Regeln. Abkürzungen, die lediglich in einzelnen Tabellen verwendet wurden, sind in deren Beschriftung gesondert angegeben. Die Namen von Bakterien und Proteinen wurden wie literarisch bekannt abgekürzt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Das Operon <i>hlyCABD</i> mit den Genen für Modifikation (<i>hlyC</i>), α -Hämolysin (<i>hlyA</i>) und Sekretion (<i>hlyB</i> und <i>hlyD</i>).	8
Abb 1-2: Schematische Darstellung von HlyA.	9
Abb. 1-3: Porenbildende Region von HlyA.	10
Abb. 1-4: Sekretion von HlyA durch HlyB, HlyD und TolC.	13
Abb. 2-1: Plasmid pyA-WT.	19
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese.	23
Abb. 2-3: Strukturformel von Badan.	31
Abb. 2-4: Schematische Darstellung des Prinzips der Coimmunpräzipitation von HlyA	35
Abb. 3-1: Die prozentuale Hämolyse einer konstanten Menge des aktiven Toxins HlyA-28C gemischt mit steigenden Mengen des nicht-lytischen Toxins HlyA- Δ B.	40
Abb. 3-2: Der Einfluss der beiden nicht-lytischen Toxinmutanten HlyA- Δ B und HlyA-284P287P auf die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität von HlyA-S288C.	41
Abb. 3-3 : Coimmunpräzipitation von HlyA-HA und biotinyliertem HlyA mit EZview TM Red Anti-HA Affinity Gel.	43
Abb. 3-4: Coimmunpräzipitation mit Immobilized NeutrAvidin TM Gel.	43
Abb. 3-5: Strukturformeln der in der Arbeit verwendeten Crosslinker DMA, DSS und EGS.	44
Abb. 3-6: Einsatz von Crosslinkern für <i>E. coli</i> α -Hämolysin auf künstlichen Liposomen.	45
Abb. 3-7: Toxininduzierte Calceinfreisetzung aus künstlichen, Calcein-gefüllten Liposomen.	46
Abb. 3-8: Vergleich der konzentrationsabhängigen hämolytischen Aktivität des HlyA-Derivates Δ 1-50 im Vergleich zu Wildtyp-HlyA.	48
Abb. 3-9: Lyse humaner Keratinozyten nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Wildtyp-Toxins und HlyA- Δ 1-50.	48
Abb. 3-10: Schutzversuche zum Vergleich der Porengröße von Wildtyp-HlyA und dem Derivat HlyA- Δ 1-50.	50
Abb. 3-11: Westernblot: Bindungsstudien der Toxin-Deletionsmutante HlyA- Δ 1-100 im Vergleich zu Wildtyp-HlyA	51
Abb. 3-12: Osmo-Protektion zur vergleichenden Darstellung der Porengröße von Wildtyp-HlyA und HlyA- Δ 1-100.	52
Abb. 3-13: Fluoreszenz-Emissionsspektren des Badanmarkierten HlyA-Derivates S27C (A) und des monoacylierten, nicht lytischen HlyA-Derivates Δ B/S27C (B).	53
Abb. 3-14: Verschiebung des Badan-Fluoreszenzmaximums bei Toxinderivaten mit N-terminal eingeführten Cysteinen.	54
Abb. 3-15: Verschiebung des Emissionsmaximums von Badan bei nicht-lytischen Toxinderivaten (Δ B) mit N-terminal eingeführten Cysteinen.	55
Abb. 3-16: Verschiebung der Emissionsmaxima bei dem Badanmarkierten HlyA-Derivat S26C auf Ghosts (Blueshift) und nach Lyse der Ghosts mit Triton (Backshift) im Vergleich zu dem entsprechenden monoacylierten Toxinderivat Δ B/S26C (Mutation Lysin 690) und dem nicht acylierten Toxinderivat Δ AB/26C (Mutation Lysine 564 und 690).	56
Abb. 3-17: Doppelprolinsubstitutionen in putativ α -helicalen Domänen der N-terminalen Hälfte von HlyA.	59
Abb. 3-18: Verschiebung des Badan-Fluoreszenzmaximums bei Cysteinsubstituierten HlyA-Derivaten.	63

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Bakterienstämme und Zelllinien	17
Tab.2-2: Zur Amplifikation und Mutagenese eingesetzte Oligonukleotide.	20
Tabelle 2-3 : Pipettierschema für PCR-Ansätze.	22
Tab. 2-4: Osmoprotektoren	30
Tab. 2-5: Pipettierschema für SDS-Gele.	33
Tab. 3-1: HlyA-Derivate mit Doppelprolinmutation unter Angabe der putativ α -helicalen Aminosäurebereiche und der hämolytischen Aktivität.	57
Tab.3-2: Verschiebung der Emissionsmaxima der Badanmarkierten Aminosäure 288C in HlyA-Derivaten mit Doppelprolinsubstitution.	61

