

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

**„Untersuchungen zur Struktur und Funktion des  
*Vibrio cholerae* Cytolysins“**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der  
Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Sabine Löhner  
geb. in Frankfurt am Main/Höchst

Mainz, 08.12.2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2009

---

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	6
1.2. Bakterielle Toxine	6
1.3. Porenbildende Toxine	7
1.4. Bindung an Membranen	10
1.5. Mechanismus der Porenbildung von PFTs	10
1.6. Zelluläre Reaktionen	14
1.7. <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin	16
1.8. Strukturelle Charakteristika von $\beta$ -PFTs	12
1.9. Ziel der Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Geräteliste	20
2.2. Chemikalien und Biochemikalien	20
2.2.1. Chemikalien	20
2.2.2. Enzyme	21
2.2.3. Inhibitoren	21
2.2.4. Thiol-reaktive Substanzen	21
2.2.5. Radiochemikalien	21
2.2.6. Kits	22
2.2.7. Lösungen	22
2.3. Antikörper	22
2.4. Plasmide	22
2.5. Oligonukleotide	23
2.6. Kulturmedien	25
2.7. Verwendete Antibiotika	25
2.8. Bakterienstämme	25
2.9. Eukaryontische Zelllinien	25
2.10. Zellkulturmedien	26
2.11. Standardlösungen und Puffer	26
2.12. Kulturbedingungen <i>E. coli</i>	26
2.13. Allgemeine Kulturbedingungen HaCaT	26
2.14. Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	26
2.15. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.16. <i>in vitro</i> Mutagenese	27
2.16.1. Konstruktion von Aminosäuresubstitutions-Varianten	27
2.16.2. Konstruktion von Deletions-Konstrukten	28

---

2.17. PCR-Ansätze	28
2.18. Agarose-Gelelektrophorese	29
2.19. Präparative PCR	29
2.20. Restriktionsspaltung und Ligation	29
2.21. Ligation und Transformation	30
2.22. DNA-Analyse durch Agarosegelelektrophorese	30
2.23. DNA-Sequenzierung	30
2.24. Reinigung von Pro-VCC unter renaturierenden Bedingungen	31
2.24.1. Heterologe Expression in <i>E.coli</i> M15-Zellen	31
2.24.2. Affinitätsreinigung von His <sub>6</sub> -tag-Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	31
2.25. Reinigung von Pro-VCC unter nicht-renaturierenden Bedingungen	32
2.25.1. Heterologe Expression in <i>E.coli</i> Origami B-Zellen	32
2.25.2. Affinitätsreinigung von löslichem His <sub>6</sub> -tag-ProVCC	32
2.26. Proteinbestimmung	33
2.27. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.28. Western-Blot Analyse und immunologische Detektion mit Antikörper	34
2.29. Spaltung durch Tabacco Etch Virus (TEV)-Protease	34
2.30. Hämolyse	35
2.30.1. Gewinnung und Aufbereitung von Kaninchen Erythrozyten	35
2.30.2. Bestimmung der hämolytischen Wirkung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin	35
2.30.3. Osmotischer Schutz	35
2.31. Gewinnung von Kaninchen Erythrozyten Ghosts	36
2.32. Oligomerisierung von VCC und Cross-Linking Assay auf Membranen	36
2.33. Chemische Modifikation freier Sulfhydryl-Gruppen	36
2.34. Modifikation der freien Sulfhydryl-Gruppen mit [ <sup>3</sup> H]-NEM	37
2.35. Bindung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin an Membranen	37
2.35.1. Abschätzen der Bindung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin an Kaninchen Erythrozyten mittels Western-Blot Analysen	37
2.35.2. Bindung Fluoreszein-markierter Toxine an Kaninchen Ghosts	38
2.35.3. Bindung radioaktiv-markierter Toxine an Kaninchen Erythrozyten	38
2.36. Co-Oligomerisierung von aktivem Toxin mit G327C/A601C*	38
2.37. Messung intrazellulären ATPs	39
2.38. Computergestützte Methoden	39
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Nachweis der Prä-Pore als Zwischenstufe der Porenbildung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin</b>	<b>40</b>
3.1.1. Konstruktion von VCC-Doppelcystein-Derivaten	40

3.1.2.	Reinigung der Doppelcystein-Derivate _____	42
3.1.3.	Hämolytische Charakterisierung der Doppelcystein-Derivate _____	43
3.1.4.	Untersuchungen zur Bindung der Doppelcystein-Derivate an Membranen _____	45
3.1.5.	Nachweis der Prä-Pore durch Cross-linking Experimente _____	46
3.1.6.	Charakterisierung gemischter Oligomere bezüglich ihrer SDS-Stabilität _____	48
3.1.7.	Charakterisierung der porenbildenden Aktivität gemischter Oligomere _____	49
3.1.8.	Einfluss von G327C/A601C* auf die Insertionsfähigkeit von aktivem Toxin innerhalb gemischter Oligomere _____	51
3.1.9.	Gemischte Oligomere bilden Oligomere mit reduziertem funktionellen Durchmesser _____	52
<b>3.2.</b>	<b>Charakterisierung der beiden C-terminalen Domänen <math>\beta</math>-Trefoil und <math>\beta</math>-Prism</b>	<b>55</b>
3.2.1.	Reinigung und Charakterisierung des $\Delta\beta$ -Trefoil-Derivates _____	56
3.2.2.	Spaltung und Aktivierung von $\Delta\beta$ -Trefoil-ProVCC zu $\Delta\beta$ -Trefoil-VCC durch die TEV-Protease _____	59
3.2.3.	Charakterisierung der C-terminalen $\beta$ -Prism Domäne _____	61
3.2.3.1.	Reinigung und Charakterisierung des $\Delta\beta$ -Prism- und des TEV1-Derivates _____	61
3.2.3.2.	Einfluss einzelner Aminosäurereste auf die hämolytische Aktivität von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin _____	63
3.2.4.	Rolle der $\beta$ -Prism-Domäne bei der Bindung an Membranen _____	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> _____	<b>67</b>
4.1.	Nachweis der Prä-Pore als Zwischenstufe der Porenbildung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin _____	67
4.2.	Funktion der beiden C-terminalen Domänen $\beta$ -Trefoil und $\beta$ -Prism _____	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b> _____	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> _____	<b>88</b>
8.1.	Abkürzungsverzeichnis _____	88
8.2.	Abbildungsverzeichnis _____	90
8.3.	Tabellenverzeichnis _____	91
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> _____	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b> _____	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>

## 1. Einleitung

### 1.1. *Vibrio cholerae*

*Vibrio cholerae* ist ein fakultativ anaerobes Gram-negatives Stäbchen und gehört zur Familie der *Vibrionaceae*. Die Gruppe *V. cholerae* ist heterogen, beinhaltet mehr als 206 Serogruppen und wird anhand des O1 Antigens in zwei Gruppen, *V. cholerae* non-O1 und *V. cholerae* O1, unterteilt (Baumann et al., 1984). Pathogene *Vibrio cholerae*-Stämme verursachen Cholera, eine der häufigsten menschlichen Infektionskrankheiten in Entwicklungsländern, wobei die Übertragung des Mikroorganismus hauptsächlich durch Wasser erfolgt (Datta-Roy et al., 1986). Das Cholera-Toxin gehört zur Gruppe der Exotoxine und verursacht einen lebensbedrohlichen wässrigen Durchfall, der zur Dehydrierung und zum Tod führen kann. *Vibrio cholerae*-Stämme produzieren neben dem Cholera-Toxin eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Hämolysine, Proteasen, Lipasen oder Cytotoxine. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem auch *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC), ein porenbildendes Toxin, das in Membranen inseriert und sie permeabilisiert (Zitzer et al., 1995; Dalsgaard et al., 1995; Honda & Finkelstein, 1979; Laohachai et al., 2003; Yamamoto et al., 1986). Nach subkutaner Gabe induziert VCC Ödembildung und es kommt im Gegensatz zum Cholera-Toxin nach der Injektion in Darmschlingen zu einer Ansammlung von schleimiger und blutiger Flüssigkeit (Ichinose et al., 1987). Die genaue pathogene Relevanz von VCC wurde bislang jedoch nicht eindeutig geklärt.

### 1.2. Bakterielle Toxine

Viele pathogene Bakterien produzieren toxische Substanzen, die sowohl gegen andere Bakterien als auch gegen Wirtsorganismen gerichtet sind. Es wird zwischen Endotoxinen, die Bestandteile der äußeren Membran darstellen, und Exotoxinen, die von Bakterien sezerniert werden, unterschieden. Bei Endotoxinen handelt es sich um Komponenten der Zellwand Gram-negativer Bakterien, die nach der Autolyse der Mikroorganismen freigesetzt werden, den so genannten Lipopolysacchariden (LPS). LPS besteht aus drei Komponenten, die miteinander verbunden sind. Lipid A bildet den inneren Bereich des LPS, ist in die Membran verankert und für die toxische Wirkung verantwortlich (Galanos et al., 1977). Die hydrophobe Kernregion ist an Lipid A gebunden und besteht im Wesentlichen aus 2-Keto-3-desoxy-Octonat (Lugtenberg & van Alphen, 1983). Das terminale O-Polysaccharid (O-Antigen) ist

aus einer veränderlichen Anzahl an Tri-, Tetra- und Pentasacchariden aufgebaut und wird unter anderem zur Differenzierung pathogener und nicht pathogener Bakterien verwendet (Galanos et al., 1977). Die Bindung des Toxins an Rezeptoren führt zur Produktion verschiedener Zytokine wie z.B. Interleukin IL-1, IL-6 oder IL-8 und des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$ , wodurch das Komplementsystem aktiviert und daher stets die gleichen allgemeinen Krankheitssymptome, wie Fieber und Schmerzen, verursacht werden. Exotoxine gehören zu den Hauptvirulenzfaktoren und werden aktiv von Bakterien in das umgebene Medium sezerniert. Zu dieser Gruppe gehören neben den binären A-B Toxinen Cytolysine und Superantigen-Exotoxine. Bei A-B Toxinen ist die enzymatische und rezeptorbindende Funktion auf zwei unterschiedlichen Polypeptiden lokalisiert. Die A-Untereinheit beinhaltet die Toxin-Aktivität, während die B-Untereinheit die Bindung an Rezeptoren und zusätzlich den Transport der A-Untereinheit über die Membran vermittelt. Zu den bekanntesten Beispielen zählt unter anderem Diphtherie-Toxin (Barth et al., 1998, Alouf & Freer, 1999), Cholera-Toxin (Alouf & Freer, 1999) oder Anthrax-Toxin (Alouf & Freer, 1999).

Cytolysine verursachen eine Schädigung der Plasmamembran, die zum Zelltod führt (Ludwig et al., 1999). Die Lyse erfolgt entweder durch die Bildung von Poren in der Membran oder durch enzymatischen Abbau der Plasmamembran durch Phospholipasen (Bhakdi & Trantum-Jensen, 1987). Zu den bekanntesten Vertretern der porenbildenden Toxine zählen  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* oder Streptolysin O aus *Streptococcus pyrogenes*.

Die Wirkung der Superantigen-Exotoxine hingegen beruht auf der Reaktion des Immunsystems auf das Toxin, nicht auf der Wirkung des Toxins selbst. Superantigen-Toxine binden unspezifisch an MHC und T-Zell-Rezeptoren, wodurch die Produktion von Zytokinen hyperstimuliert (Superantigen aus *Staphylococcus aureus*) wird. Der daraus resultierende Toxische Schock führt wiederum zur Stimulation anderer Zellen, wodurch starke Entzündungsreaktionen ausgelöst werden.

### 1.3. Porenbildende Toxine

Porenbildende Toxine (Pore-forming toxins - PFTs) repräsentieren die größte Klasse bakterieller Toxine und sind oft wichtige Virulenzfaktoren der pathogenen Erreger (Van der Goot, 2001). PFTs werden sowohl von Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien produziert (Parker & Feil, 2005). Im Gegensatz zu PFTs, die von gram-positiven Bakterien

gebildet werden, benötigen von gram-negativen Bakterien produzierte PFTs posttranslationale Modifikationen, um ihre Funktionalität zu erlangen. Bisher konnten zwei verschiedene Modifikationen identifiziert werden: Zum einen die proteolytische Aktivierung des Pro-Toxins, wie zum Beispiel Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* (Van der Goot et al., 1992, Parker et al., 1996) oder *Vibrio cholerae* Cytolysin (Hall & Drasar, 1990), zum anderen die Acylierung von Fettsäuren, die bereits für viele RTX-Toxine beschrieben wurde (Issartel et al., 1991). Eine weitere interessante Gruppe der PFTs ist die Familie der Aktinoporine, deren Toxine von Seeanemonen (Klasse: Anthozoa; Ordnung: Actiniaria) produziert werden. Basierend auf den Strukturen die in Membranen inserieren, werden zwei Gruppen unterschieden.  $\alpha$ -PFTs sind reich an  $\alpha$ -helikalen Strukturen und enthalten porenbildende Domänen mit bis zu zehn  $\alpha$ -Helices, die eine hydrophobe helikale Harnadel-Struktur einschließen (Parker et al., 1994). Die meisten bekannten PFTs gehören zur Gruppe der  $\beta$ -PFTs, sind reich an  $\beta$ -Faltblättern und bilden ein  $\beta$ -Barrel durch Insertion amphipatischen  $\beta$ -Hairpin-Strukturen in die Membran (Montoya & Gouaux, 2003). Zur Klasse der  $\beta$ -PFTs gehören unter anderem  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Montoya & Gouaux, 2003), Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* sowie *Vibrio cholerae* Cytolysin (Parker et al., 1994, Iacovache et al., 2006; Hall & Drasar, 1990).

$\alpha$ -PFTs werden von einer Vielzahl von Organismen produziert und sind unter anderem gegen Bakterien, Insekten, Käfer und Säugetiere gerichtet. Auf den ersten Blick haben die Mitglieder dieser Gruppe außer der helikalen Struktur nur wenige Gemeinsamkeiten. Die bekanntesten Vertreter der  $\alpha$ -PFTs sind die von *Escherichia coli* produzierten Colicine (Lakey et al., 2001). Zusätzlich beinhaltet diese Klasse *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (Allured et al., 1986), einige aus Insekten stammende  $\delta$ -Endotoxine (Cry) (Li et al., 1991), das Diphtheria Toxin (Choe et al., 1992) sowie die von der Seeanemone *Actinia equina* produzierten Equinatoxine (Anderluh & Macek, 2002). Colicine gehören zur Klasse der Antibiotika und werden durch eine Vielzahl von *E. coli*-Stämmen produziert. Sie sind gegen andere Stämme oder nah verwandte Bakterien gerichtet, werden in einer großen Menge produziert und mit Hilfe eines zusätzlichen Proteins, das die äußere Membran des Produzenten lysiert, in den extrazellulären Raum sekretiert. Nach der Bindung an die Zielmembran über Rezeptoren werden Colicine über die äußere Membran transportiert, und über das bakterielle Transportsystem ins Periplasma der Zielzelle aufgenommen. Zahlreiche Prozesse, wie die Inhibierung der Proteinsynthese oder die Reduktion des cytoplasmatischen Membranpotentials durch die Bildung einer Pore, führen daraufhin zum Tod der Zielzelle.



Equinatoxin II, aus der Familie der Aktinoporine, bildet Kation-selektive Poren in der Membran, die einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 20 Å besitzen (Tejuca et al., 2001) und vermutlich aus drei bis vier Monomeren bebildet werden (Belmonte et al., 1993; Tejuca et al., 1996). Durch die Porenbildung wird die Permeabilität der Membranen für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und andere kleinere Substanzen erhöht, die zu einem kollektiven osmotischen Schock führt der die Lyse der Erythrozyten-Membran verursacht. Bislang ist allerdings nicht geklärt, welche Struktur die transmembranen Domänen des Toxins in der Membran annehmen.

Die Cholesterol-dependent Cytolysine (CDCs) stellen die größte Gruppe der  $\beta$ -PFTs, mit über 20 Mitgliedern, dar und werden von einer Vielzahl verschiedener Gram-positiver Bakterien produziert (Tweten et al., 2001). Zu diesen Virulenzfaktoren gehören unter anderem Perfringolysin O (PFO) aus *C. perfringens* (Rossjohn et al., 2007), Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyrogenes* (Madden et al., 2001), Pneumolysin aus *S. pneumoniae* und Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* (Parker & Feil, 2005; Tweten, 2005). Wie der Name vermuten lässt, ist Cholesterol für die Aktivität dieser Toxine von Bedeutung (Giddings et al., 2003). Der Schritt, an dem Cholesterol für die Aktivität notwendig ist, zum Beispiel bei der Bindung an Membranen, der Oligomerisierung oder der Insertion, variiert hingegen von Toxin zu Toxin (Giddings et al., 2003). PFO bindet direkt an Cholesterol, wodurch die Konformation des Proteins verändert wird, bei anderen CDCs, wie zum Beispiel LLO oder Intermedilysin (ILY) ist nicht Cholesterol der Rezeptor, sondern GPI-verankerte Moleküle, und Cholesterol wird erst bei der Porenbildung von ILY essentiell (Soltani et al., 2007; Iacovache et al., 2008). CDCs besitzen ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa und bilden Poren mit bis zu 50 Monomeren, die jeweils zwei  $\beta$ -Haarnadel-Strukturen in die Membran inserieren (Parker & Feil, 2005; Tweten, 2005). Die meisten CDCs werden extrazellulär produziert und lysieren Zielzellen durch die Insertion in die Plasmamembran. Andere pathogene Organismen, wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes*, können jedoch CDCs sowohl extrazellulär (Bavdek et al., 2007) als auch nach der Aufnahme in die Zielzelle durch Phagozytose (Moors et al., 1999) produzieren. Die Insertion des von *Listeria monocytogenes* produzierten Listeriolysin O (LLO) in die phagosomale Membran führt im Anschluss zu einer Freisetzung des Bakterium in das Cytoplasma der Zielzelle (Gonzalez et al., 2008).

#### 1.4. Bindung an Membranen

Für eine Vielzahl der PFTs wurden Rezeptoren zur Bindung an Membranen identifiziert. Sie beinhalten Transmembranproteine als Rezeptoren für die B-Untereinheit von AB-Toxinen, (Scobie et al., 2005), lipidverankerte Proteine im Fall von Aerolysin (Nelson et al., 1997), Lipide als Rezeptoren für CDCs (Tweten et al., 2001) und spezifische Lipid-Cluster, wie z.B. für  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* postuliert (Valeva et al., 2006). Die von der Seeanemone *Actinia equina* produzierten porenbildenden Equinatoxine stellen eine interessante Gruppe der  $\alpha$ -PFTs dar. Die Aktivität dieser Toxine ist fast ausschließlich auf Membranen mit Sphingomyelin beschränkt, wobei Cholesterol in einigen Fällen die Funktion von Sphingomyelin ersetzen kann. Die Bindung von Equinatoxin II, einem 20 kDa-Toxin das aus einem 12-strängigen  $\beta$ -Sandwich und zwei  $\alpha$ -Helices besteht, ist vermutlich ein zweistufiger Prozess (Hong et al., 2002). Zunächst interagieren aromatische Aminosäuren eines Loops des  $\beta$ -Sandwichs und der C-terminalen Helix mit der Membran. Im zweiten Schritt interagiert die N-terminale Helix irreversibel mit der Membran und liegt vor der Insertion flach auf der Membran (Malovrh et al., 2003). Die Kristallstruktur eines weiteren Toxins aus einer anderen Seeanemone, Sticholysin II das große Ähnlichkeit zu Equinatoxin II aufweist, wurde von Mancheño et al. (2003) im Komplex mit Phosphatidylcholin gelöst. Die Bindungsstelle für Phosphatidylcholin wird von Seitenketten der zweiten Helix, der Spitze des  $\beta$ -Sandwichs und einem aromatischen Rest gebildet, die auch alle in Equinatoxin konserviert sind.

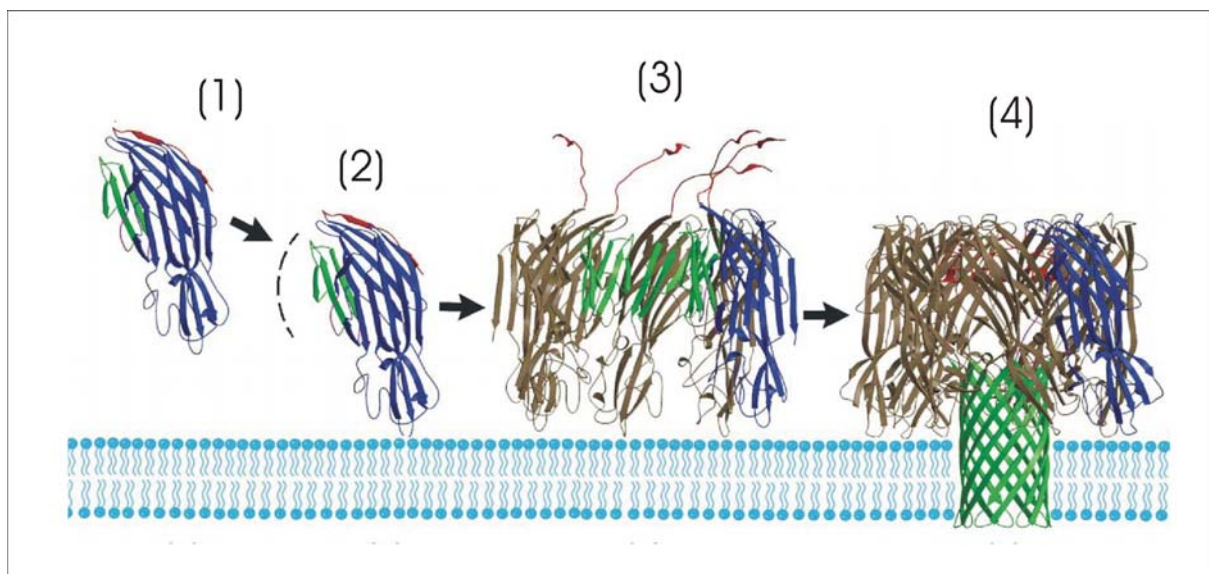
Spezifische Rezeptoren bieten  $\beta$ -PFTs mehrere Vorteile: sie stellen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche dar, wodurch die lokale Toxinkonzentration und dadurch die Wahrscheinlichkeit von Monomer-Monomer Interaktionen erhöht wird, ein wichtiger Schritt bei der Porenbildung. Da Rezeptoren schon in Clustern organisiert in der Membran vorliegen, und die Tendenz besitzen, mit anderen spezifischen Membrandomänen zu assoziieren, wird die lokale Toxinkonzentration auf der Membran auf diese Weise zusätzlich erhöht (Tilley & Saibil, 2006).

#### 1.5. Mechanismus der Porenbildung von PFTs

$\beta$ -PFTs haben eine interessante Strategie entwickelt, um sowohl das Stadium des wasserlöslichen Monomers als auch des aktiven membraninsetierten Toxins zu vereinigen.

Die Transmembran-Domänen nehmen in der wasserlöslichen Form eine Faltung an, bei der die hydrophoben Oberflächen verdeckt werden. Nach der Bindung des Monomers und Insertion in die Membran werden diese Regionen zu  $\beta$ -Hairpins umgewandelt, und die Oligomerisierung führt zu einer großen hydrophobe Oberfläche in Form einer membrandurchspannenden  $\beta$ -Barrel.

Der Mechanismus der Porenbildung ist am besten bei  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Valeva et al., 1997; Song et al., 1996; Gouaux, 1997) untersucht, das strukturelle Ähnlichkeiten zur cytolytischen Domäne von VCC aufweist.  $\alpha$ -Toxin wird in wasserlöslicher Form als Monomer sezerniert und bindet an die Zielmembran. Das membrangebundene Monomer oligomerisiert und bildet über ein Zwischenstadium, der so genannten Prä-Pore, die membraninsetzierte Pore (Walker et al., 1992; Valeva et al., 1997; Olson et al., 1999; Kawate & Gouaux, 2003) (Abbildung 1). Dabei stellt das Heptamer einen wassergefüllten Kanal in der Lipiddoppelschicht dar, der für die Zerstörung des zellulären osmotischen Gleichgewichts und den Zelltod verantwortlich ist.



**Abbildung 1: Mechanismus der Porenbildung für  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*.**

Nach der Bindung des wasserlöslichen Monomers (1) an die Membran (2) diffundieren die einzelnen Monomere lateral auf der Membran und oligomerisieren zu einer insertionskompetenten Struktur, der Prä-Pore (3). Im letzten Schritt inserieren die Pre-Stems in die Membran und bilden eine 14-strängige  $\beta$ -Barrel (4). Quelle: Olson & Gouaux, 2005.

Die Bildung eines Prä-Poren Komplexes stellt vermutlich ein gemeinsames Zwischenstadium der Porenbildung vieler  $\beta$ -PFTs dar, und wurde bislang für mehrere CDCs (Tweten et al., 2001), *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin (Fang et al., 1997) oder *C. septicum*  $\alpha$ -Toxin (Sellman & Tweten,

1999) nachgewiesen. Dennoch oligomerisieren nicht alle Toxine während der Porenbildung zu einer insertionskompetenten Prä-Pore. Bei der Porenbildung von Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* scheinen Oligomerisierung, Faltung der transmembranen  $\beta$ -Barrel und Insertion in die Membran gekoppelte Vorgänge zu sein (Iacovache et al., 2006), ähnlich wie für einige Membranproteine postuliert (Tamm et al., 2001).

Obwohl die Klasse der  $\alpha$ -PFTs viele Pathogene beinhaltet, ist der genaue Mechanismus der Porenbildung, sowie die Struktur der Pore bislang nicht eindeutig geklärt. Die Porenbildung erfordert drei Schritte: Bindung, Entfaltung und Insertion (Zakharov et al., 2004). Die porenbildende Domäne ist in einer Triplex-Struktur mit bis zu zehn  $\alpha$ -Helices aufgebaut, die eine hydrophobe heikale Haarnadel-Struktur einschließen (Athanasiadis et al., 2001). Nach der Bindung des Toxins wird die porenbildende Domäne entfaltet, wodurch die hydrophoben Helices freigesetzt und die Insertion initiiert wird. Die Ansäuerung des Endosoms spielt bei der Entfaltung des Diphtheria-Toxins eine entscheidende Rolle (Zhao et al., 2005). Es wird postuliert, dass einzelne Aminosäuren als pH-Sensor sowohl bei Colicinen als auch bei Enterotoxin A agieren, und die Verringerung des pH-Wertes zur Zerstörung von Salz-Brücken und Wasserstoffbrückenbindungen führt, wodurch die Entfaltung der Toxine gefördert wird (Musse & Merrill, 2003). Die Bildung oligomerer Stadien bei  $\alpha$ -PFTs konnte bislang nur in einem Fall beobachtet werden. Monomere von Cry1Ab binden an die Zielmembran über einen Rezeptor, und oligomerisieren zu einem tetrameren Komplex, wodurch die Bindung an einen zweiten Rezeptor ermöglicht und die Pore gebildet wird (Bravo et al., 2004).

## 1.6. Zelluläre Reaktionen

Die angeborene Immunität stellt die erste Barriere in der Abwehr des Wirts gegen viele Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren, etc. dar. An der Immunantwort sind insbesondere Makrophagen und Neutrophile beteiligt, aber auch Epithelzellen, die die erste physikalische Barriere darstellen. Im Gegensatz zur erworbenen Immunität, die auf Millionen Zelloberflächenrezeptoren basiert, ist die Antwort des erworbenen Immunsystems unspezifisch und basiert auf einer kleineren Anzahl an Rezeptoren, den so genannten Pattern recognition receptors (PRRs) (Gonzalez et al., 2008). Diese Rezeptoren erkennen strukturelle Komponenten, wie zum Beispiel Peptidoglycan, Flagellin, Lipopolysaccharide, etc., von Mikroorganismen zu erkennen, die so genannten pathogen-associated molecular pattern

(PAMPs). Zur Gruppe der PRRs gehören unter anderem auch Toll-like receptors (TLRs) (Medzhitov, 2001), Transmembranproteine, die an der Erkennung von Mikroorganismen im extrazellulären Raum und dem Endosom beteiligt sind. Analog zu den TLRs wurde eine andere Familie der PRRs, die Nod-like receptors (NLRs) (Martinon et al., 2005) entdeckt, die aber im Gegensatz zu den TLRs im Cytoplasma lokalisiert sind und nach der Behandlung der Zellen mit verschiedenen PFTs aktiviert werden. Als Folge kommt es zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Caspase-1. NF- $\kappa$ B, ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, aktiviert wiederum Gene, die für Cytokine und „co-stimulatory factors“ kodieren (Bonizzi et al., 2004). Der an der Caspase-1-Aktivierung beteiligte Multienzymkomplex wird auch als Inflammasom bezeichnet (Martinon F, 2002), und sowohl für  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* als auch Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* konnte eine Aktivierung des Inflammasoms nachgewiesen werden (Martinon et al., 2002; Walev et al., 1995). Die Porenbildung von LLO führt zu mehreren zellulären Effekten, wie Tyrosin-Phosphorylierung (Gekara, et al., 2004), Aktin-Reorganisation (Cossart et al., 2004), NF- $\kappa$ B Aktivierung (Kayal et al., 1999) sowie Regulation der Genexpression durch Histon-Modifikationen (Hamon et al., 2007). Zusätzlich wurde bei LLO und *Escherichia coli* Hämolysin (Uhlen et al., 2000; Koschinski et al., 2006) Calcium-Oszillation beobachtet, die viele zelluläre Funktionen wie Cytokin-Synthese, Apoptose, Degranulation etc. (Cossart et al., 2003; Gekara et al., 2008) reguliert.

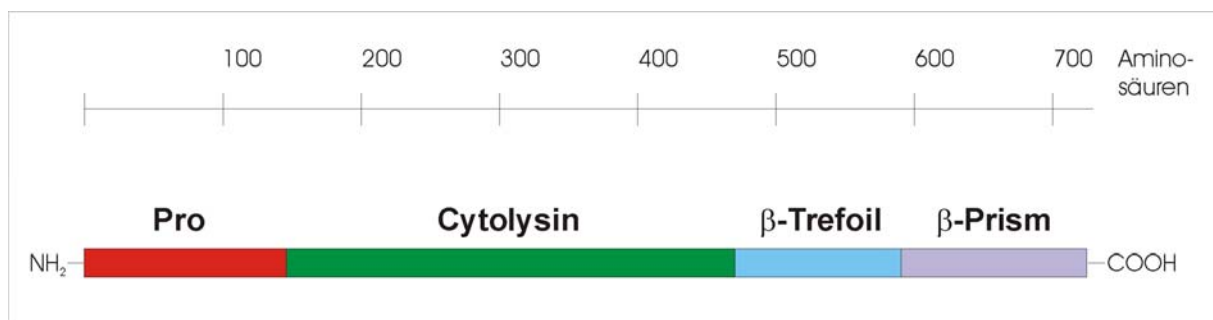
Durch die Wirkung porenbildender Toxine werden auch andere Signalwege wie zum Beispiel der p38 mitogen aktivierte Protein-Kinase (MAPK) Signalweg induziert, wodurch das Überleben der Zellen gefördert wird. Die Aktivierung von p38 konnte unter anderem für PLY (Husman et al., 2006), SLO (Ratner et al., 2006) und  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (Stassen et al., 2003) nachgewiesen werden. Zusätzlich zum p38 Signalweg werden weitere Signalwege wie der c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Weg durch SLO aktiviert, der zur TNF- $\alpha$ -Produktion führt. Als zelluläre Abwehr, induziert durch Porenbildung von *Vibrio cholerae* Cytolysin, wird sowohl die Vacuolation als auch die Autophagie in Zielzellen induziert (Gutierrez et al., 2007). Während der Infektion und nach der Zugabe gereinigten Toxins, spielt die Autophagie eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort und fördert das Überleben der Zelle.

Da sich porenbildende Toxine sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Struktur stark voneinander unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass die Erkennung der Toxine nicht durch

TLRs oder NLRs erfolgt, sondern die Auswirkungen der Toxine auf die Zelle detektiert werden, die ähnlich für Toxine mit ähnlicher Aktivität sind.

### 1.7. *Vibrio cholerae* Cytolysin

*Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) ist ein porenbildendes Toxin, das sowohl von *Vibrio cholerae* El Tor O1 und non-O1 Stämmen sezerniert wird und zur Bildung heptamere Poren (Harris et al., 2002), mit einem geschätzten Radius zwischen 0,7 nm (Zitzer et al., 1996) und 1,6 nm (Ikigai et al., 1996; Yuldasheva et al., 2001) führt. Das Strukturgen *hlyA* kodiert ein prepro-Toxin mit einem Molekulargewicht von 82 kDa, das aus einem Signalpeptid mit 25 Aminosäuren, einer Pro-Region mit 132 Aminosäuren, der cytolytischen Region (325 Aminosäuren) und den zwei C-terminalen lektin-ähnlichen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism (Yamamoto et al. 1990; Olson & Gouaux, 2005) besteht (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von *Vibrio cholerae* Cytolysin.**

Die Pro-Domäne ist in rot, die cytolytische Domäne in grün und die beiden Lektin-ähnlichen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism in blau bzw. violett dargestellt.

Das reife Toxin wird durch einen zweistufigen Prozess gebildet, bei dem zunächst das Signalpeptid bei der Translokation des Toxins durch die innere Membran abgespalten und das 79 kDa Pro-Toxin sezerniert wird. Der zweite Schritt, die proteolytische Spaltung des Toxins, ist notwendig zur Aktivierung (Yamamoto et al., 1990) des Toxins und erfolgt extrazellulär. Pro-VCC wird sowohl in Lösung als auch nach der Bindung an Membranen gespalten. Nach der Bindung von Pro-VCC an Membranen erfolgt die Spaltung sowohl durch exogene als auch endogene Proteasen, wobei die Metalloprotease ADAM-17 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Pro-VCC spielt (Valeva et al., 2004). Im Gegensatz zu Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila*, das ebenfalls als Pro-Toxin sezerniert wird, spielt Furin bei der Aktivierung von Pro-VCC keine entscheidende Rolle (Abrami et al., 1998). Neben Furin konnten auch MMP-2, MMP-9 sowie Serinproteasen ausgeschlossen werden (Valeva et al.,

2004). Zusätzlich wirkt die N-terminale Pro-Region als molekulares Chaperon und ist für die korrekte Faltung des reifen Toxins notwendig. (Nagamune et al., 1997). Die beiden globulären C-terminalen Domänen,  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism, besitzen eine Lektin-ähnliche Faltung und sind vermutlich an der Bindung des Toxins beteiligt (Rutenber et al., 1987).

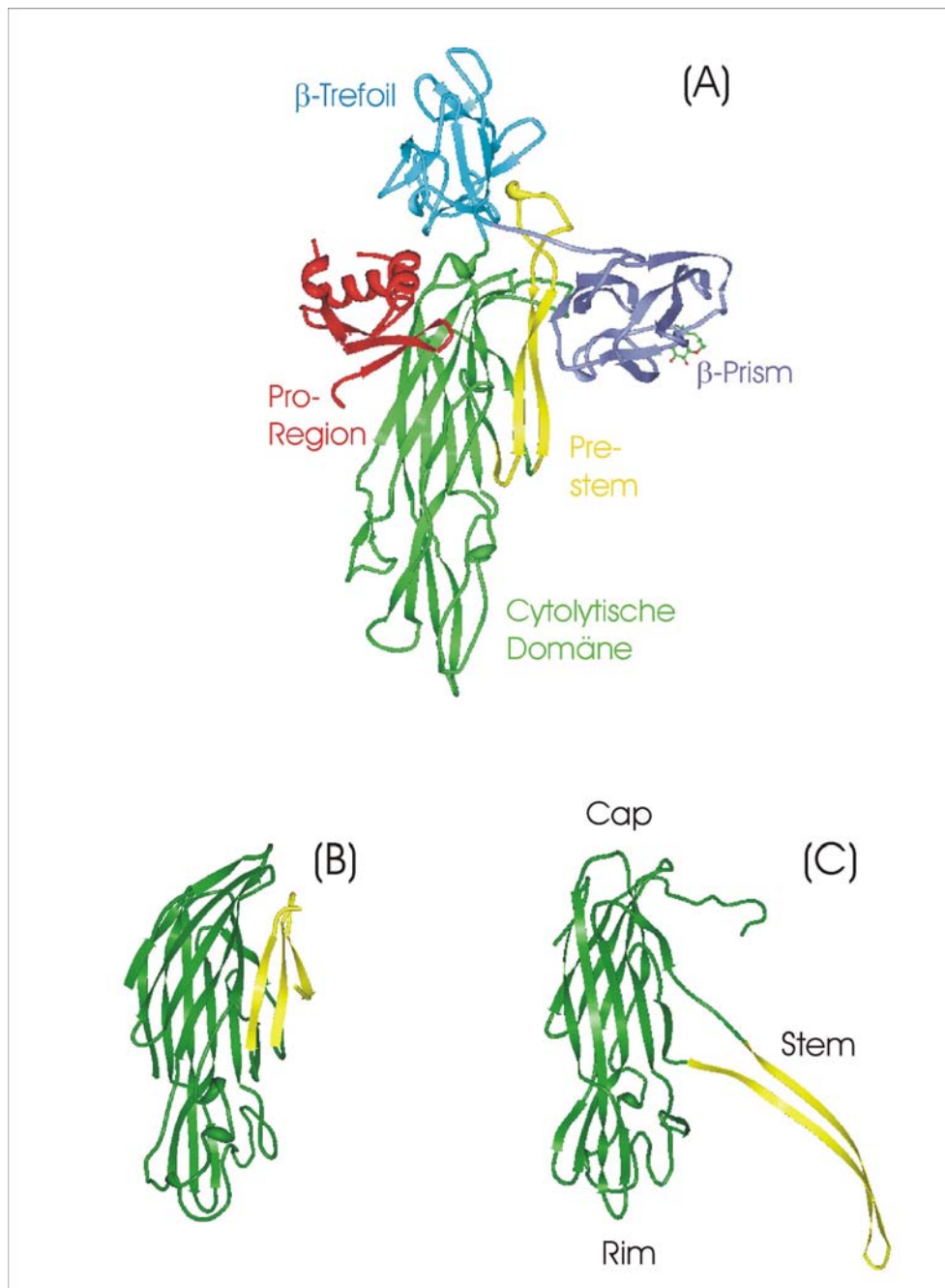
Die Bindung von VCC-Monomeren an Membranen erfolgt temperaturunabhängig. Mittels biochemischer Methoden konnte gezeigt werden, dass VCC eine hohe Affinität zu Membranen mit Cholesterol und Sphingolipiden besitzt (Zitzer et al., 1999). Obwohl angenommen wird, dass Cholesterol eine wichtige Rolle bei der Oligomerisierung spielt, ist bislang wenig über die Art der Bindung von VCC an Zielmembranen bekannt. Durch Studien von Saha et al. 1996 konnte gezeigt werden, dass VCC Lektin-ähnliche Eigenschaften und eine Präferenz für den terminalen  $\beta$ 1-Galaktosyl-Rest von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche besitzt. Zusätzlich wurde die Bindung von VCC an Glykophorin B, einem transmembranes Sialoglykoprotein der Erythrozytenmembran, oder einem mit Glykophorin assoziierten Moleküls postuliert (Zhang et al., 1999). Da VCC sowohl Lektin-ähnliche Eigenschaften (Saha et al., 1996) als auch eine hohe Affinität zu Membranen mit Cholesterol besitzt (Zitzer et al., 1999), werden zwei Bindungsdomänen für *Vibrio cholerae* Cytolysin postuliert. Es wird vermutet, dass Pro-VCC durch die Interaktion mit zuckerhaltigen Strukturen an die Membran bindet, dort proteolytisch aktiviert wird, und im Anschluss als VCC mit Kopfgruppen von Membranphospholipiden interagiert.

Neben *Vibrio cholerae* wurden auch andere humanpathogene Bakterien charakterisiert, die Cytolysine mit ähnlichen Eigenschaften wie VCC besitzen. Dazu gehören unter anderem *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* sowie *V. fluvialis* (Ichinose et al., 1987; Yamamoto et al., 1990; Hirono et al., 1996; Ikigai et al., 1996; Kim et al., 1997; Rahman et al., 1997; Choi et al., 2002; Han et al., 2002; Kothary et al., 2003). So zeigen die Aminosäuresequenzen von *Vibrio mimicus* Hämolysin (VMH) sowie *Vibrio fluvialis* Hämolysin (VFH) eine Identität von 82 % bzw. 73 % und auch die Sequenz von *Vibrio vulnificus* Hämolysin (VVH) zeigt Ähnlichkeiten zu VCC (17 %). *Vibrio vulnificus* stellt eine Besonderheit dar, da sowohl die Pro-Region als auch die C-terminale  $\beta$ -Prism Domäne fehlen. Das Gen *vvhA* befindet sich aber in der Nähe einer kurzen kodierenden Sequenz, die zusammen mit der Cytolysin-Domäne exprimiert wird und wie die Pro-Region bei VCC als Chaperon fungieren könnte (Olson & Gouaux, 2005).

## 1.8. Strukturelle Charakteristika von $\beta$ -PFTs

Bis heute konnten die Strukturen folgender Toxine aufgeklärt werden: die heptamere Pore von *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin (Song et al., 1996), sowie die Monomere von LukF (*Staphylococcus aureus* leukocidin/ $\gamma$ -hemolysin) (Olson et al., 1999) LukF-PV (*Staphylococcus aureus* Panton-Valentin leukocidin) (Pedelacq et al., 1999), LukS-PV (*Staphylococcus aureus* Panton-Valentin leukocidin) (Guillet et al., 2004), Pro-VCC (*Vibrio cholerae* cytolysin) (Olson & Gouaux, 2005), Pro-Aerolysin (*Aeromonas hydrophila*) (Parker et al., 1994) und Perfringolysin O (*Clostridium perfringens*) (Rossjohn et al., 1997). Die wasserlösliche Struktur des LukF-Monomers und die der heptamere Poren von  $\alpha$ -Toxin zeigen den ersten und letzten Schritt der Porenbildung von  $\beta$ -PFTs, und verdeutlichen, welche konformationellen Änderungen vom Monomer bis zur inserierten  $\beta$ -Barrel notwendig sind. *Vibrio cholerae* Cytolysin schien zunächst nicht zur Gruppe dieser beiden Toxine zu gehören, da weder LukF noch  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* eine N-terminale Pro-Domäne enthalten und andere funktionelle Eigenschaften besitzen. Durch genauere Sequenzanalysen wurde jedoch gezeigt, dass VCC eine zentrale Region, bestehend aus etwa 250 Aminosäuren besitzt, die homolog zur Aerolysin/Hemolysin/Leukocidin Familie ist (Olson & Gouaux, 2002). Die Kristallstruktur des wasserlöslichen VCC-Monomers wurde 2005 gelöst (Olson & Gouaux, 2005) und bestätigte die postulierte cytolytische Domäne. Diese Region stellt den funktionellen Kern des Monomers von *Vibrio cholerae* Cytolysin dar, und obwohl die Sequenzen von VCC,  $\alpha$ -Toxin und LukF stark variieren, ist die Faltung dieser Region ähnlich (Abbildung 3).





**Abbildung 3: Strukturen von  $\beta$ -PFTs.**

(A) Monomer von *Vibrio cholerae* Cytolysin (PDB code: 1XEZ), (B) Monomer von LukF aus *Staphylococcus aureus* (PDB code: 3LKF), (C) Protomer von  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* (PDB code: 7AHL). Die cytolytische Domänen sind in grün dargestellt und die porenbildende Sequenzen (pre-Stem) zusätzlich in gelb hervorgehoben. Die N-terminale Pro-Region von VCC ist in rot, die beiden C-terminalen Domänen,  $\beta$ -Prism und  $\beta$ -Trefoil, in hellblau bzw. violett dargestellt. Die Abbildung wurde mit Protein Workshop erstellt.

Ein genauerer Vergleich der Strukturen von VCC und LukF zeigt, dass sich die Pro-Domäne von VCC an der Stelle befindet, an der bei LukF der amino-latch lokalisiert ist. Dieser amino-latch verhindert Protomer-Protomer Interaktionen bei LukF und demzufolge auch die Oligomerisierung. Die Notwendigkeit der proteolytischen Spaltung von VCC, und das damit

verbundene Entfernen der Pro-Domäne, sind folglich durch die Position der Pro-Domäne zu erklären.

Wie bei  $\alpha$ -Toxin (Abbildung 3(C)) und LukF (Abbildung 3(B)) ist die cytolytische Domäne von VCC aus zwei Subdomänen zusammengesetzt, analog zur  $\beta$ -Sandwich und Rim-Domäne. Die größten strukturellen Unterschiede zeigen sich bei den einzelnen Loops, die bei VCC in der Rim-Domäne im Allgemeinen länger zu sein scheinen und ganz speziell innerhalb des Pre-Stems. Im Gegensatz zu LukF besteht der Pre-Stem von VCC aus einem zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das in Kontakt zu einem Loop des  $\beta$ -Sandwichs steht.

Sowohl LukF als auch  $\alpha$ -Toxin besitzen eine Bindungsstelle innerhalb der Rim-Domäne, die für die Bindung des Toxins an Erythrozytenmembranen und an Lipide mit Phosphocholingroupen essentiell ist. VCC fehlt dieser entsprechenden Loop, wodurch die geringe Aktivität des Toxins gegen Membranen bestehend aus PC erklärt werden könnte (Zitzer et al., 1999). Dennoch enthält die Rim-Domäne von VCC ausreichend aromatische Aminosäuren, die diese Aufgabe übernehmen können. Zusätzlich enthält die cytolytische Domäne eine Disulfidbrücke, die sowohl in LukF als auch  $\alpha$ -Toxin fehlt.

Die  $\beta$ -Trefoil-Domäne (Abbildung 3, hellblau) befindet sich oberhalb des  $\beta$ -Sandwichs der Cytolysin-Region, und beide Domänen sind durch einen Linker miteinander verbunden, der zwei aufeinander folgende Glycin-Reste enthält. Weitere Beobachtungen deuten darauf hin, dass die  $\beta$ -Trefoil Domäne nicht fest mit der cytolytischen Region verbunden ist. Durch Sequenzanalysen konnte für diese Domäne eine Ricin-ähnliche Faltung vorhergesagt, und durch die Struktur bestätigt werden. Ricin enthält zwei solcher  $\beta$ -Trefoil Domänen, die jeweils eine Zuckerbindungsstelle besitzen. Die scheinbare Dreifach-Symmetrie der  $\beta$ -Trefoil-Domäne entstand vermutlich durch Gen-Triplication, denn alle drei Domänen haben eine ähnliche Sequenz und beinhalten die konservierten QxW Motive.

Die  $\beta$ -Prism-Domäne (Abbildung 3, violett) befindet sich am C-Terminus, und vielen nah verwandten Cytolysinen, wie zum Beispiel aus *V. vulnificus*, *A. hydrophila* oder *A. salmonicida*, fehlt diese C-terminale Region (Olson & Gouaux, 2005). Genau wie Ricin besitzt auch die  $\beta$ -Prism-Domäne eine Dreifach-Symmetrie, aber im Gegensatz zu  $\beta$ -Trefoil ist diese Domäne nicht durch Sequenzwiederholungen entstanden, sondern ist aus nicht-konservierten  $\beta$ -Strängen zusammengesetzt.

## 1.9. Ziel der Arbeit

*Vibrio cholerae* Cytolysin gehört zur Gruppe der  $\beta$ -PFTs und bildet durch die Insertion von amphipatischen  $\beta$ -Faltblättern in Membranen eine heptamere Pore. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Mechanismus der Porenbildung von VCC näher charakterisiert. Da bislang die Abfolge der Porenbildung von VCC ungeklärt ist, wurde unter anderem untersucht, ob VCC vor der Insertion in Membranen zu einer Prä-Pore oligomerisiert oder die Insertion mit der Oligomerisierung einhergeht. Da VCC strukturelle Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* besitzt und der Nachweis verschiedener Intermediärstadien der Porenbildung bei diesem Toxin bereits erfolgte, wurde die verwendete Strategie in dieser Arbeit auf VCC übertragen.

Im zweiten Teil der durchgeführten Arbeit wurde die Funktion der beiden C-terminalen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism von VCC untersucht. Da beide Regionen strukturelle Ähnlichkeiten zu zuckerbindenden Toxinen aufweisen, wurde eine mögliche Rolle dieser Domänen an der Membranbindung untersucht. Durch Deletionen der einzelnen Domänen wurde der Einfluss von  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism auf die hämolytische Aktivität und die Rolle der Domänen bei der Bindung des Toxins an Membranen untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräteliste

Agarosegeldokumentation BioDocAnalyse	Biometra (Göttingen)
Bakterienschüttelinkubator	GFL (Burgwedel)
Brutschrank CO <sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Brutschrank	WTC Binder (Tuttlingen)
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Technologies (NJ, USA)
FacScan	Becton Dickinson (NJ, USA)
Flüssigszintillationszähler LS 6000 TA	Beckmann (München)
Fraktionssammler 684	Büchi (Essen)
Gefrierschrank Hera Freeze	Heraeus (Osterode)
Heizrührgerät	Ikamag RCT (Reutlingen)
Kühlschrank Profiline	Liebherr
Luminometer Lumat LB9507	Berthold Technologies (Bad Wildbach)
Mikroskop Wilovert A	Hund (Wetzlar)
Mikrowelle Microwave 800	Severin
Netzgerät 500/200	Desaga (Wiesloch)
Netzgerät Power Supply EPS 3500	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
PCR-Gerät Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Gerät Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Genesys 10UV Scanning	Thermo Spectronic (Cambridge, UK)
Photometer LaPrep P311	VWR International (Darmstadt)
Pumpe LaPrep P130	VWR International (Darmstadt)
Schüttelinkubator Polymax 1040	Heidolph (Kelheim)
Schüttelinkubator Titramax 1000	Heidolph (Kelheim)
Sonifikator Sonifier 250	Branson (Danbury, USA)
Spektrofluorometer FluoroMax™	Spex Industries (Edison, USA; München)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Reax 2000	Heidolph (Kelheim)
Wasserbad WB 12	Medingen (Freital)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge Fresco 17 Centrifuge	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge GS-6R	Beckmann (München)
Zentrifuge RC-5B	Sorvall (Bad Nauheim)

### 2.2. Chemikalien und Biochemikalien

#### 2.2.1. Chemikalien

Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Bacto™Agar	Becton & Dickinson (Heidelberg)
Bacto™Trypton	Becton & Dickinson (Heidelberg)
Bacto™Yeast Extract	Becton & Dickinson (Heidelberg)
BS <sup>3</sup>	Pierce Perbio Science (Bonn)
Dextran 4	Serva (Heidelberg)
Imidazol	Fluka (Steinheim)

Kanamycin A	Sigma (Taufkirchen)
Maltotriose	Sigma (Taufkirchen)
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	Fluka (Steinheim)
Nickel(II)-Chlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Polyethylenglykol	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin	Sigma (Taufkirchen)

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

### 2.2.2. Enzyme

BamHI	Roche (Mannheim)
DNase	Sigma (Taufkirchen)
Ligase	Roche (Mannheim)
Lysozym	Roche (Mannheim)
<i>Pfu</i> Turbo®	Stratagene (Heidelberg)
<i>Pst</i> I	Roche (Mannheim)
<i>Sal</i> I	Roche (Mannheim)
Shrimp Alkalic Phosphatase (SAP)	Roche (Mannheim)
TEV-Protease	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (Taufkirchen)

### 2.2.3. Inhibitoren

Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
PMSF	Sigma (Taufkirchen)
TAPI-O	Calbiochem (Merck, Darmstadt)

### 2.2.4. Thiol-reaktive Substanzen

Acrylodan	Molecular Probes (Eugene, OR,USA)
Biotinmaleimid	Sigma (Taufkirchen)
diazenedicarboxylic acid bis(N,N'-dimethylamide)	Sigma (Taufkirchen)
Floureszeinmaleimid	Molecular Probes (Eugene, OR,USA)
N-(1-Pyrenyl)maleimid	Sigma (Taufkirchen)
N-Ethylmaleimide	Sigma (Taufkirchen)

### 2.2.5. Radiochemikalien

**Tabelle 1: Radiochemikalien.**

Nukleotid	Aktivität	Quelle
[ <sup>3</sup> H]-NEM	40-60 Ci/mmol	NEN <sup>TM</sup>

**2.2.6. Kits**

ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche (Mannheim)
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche (Mannheim)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)

**2.2.7. Lösungen**

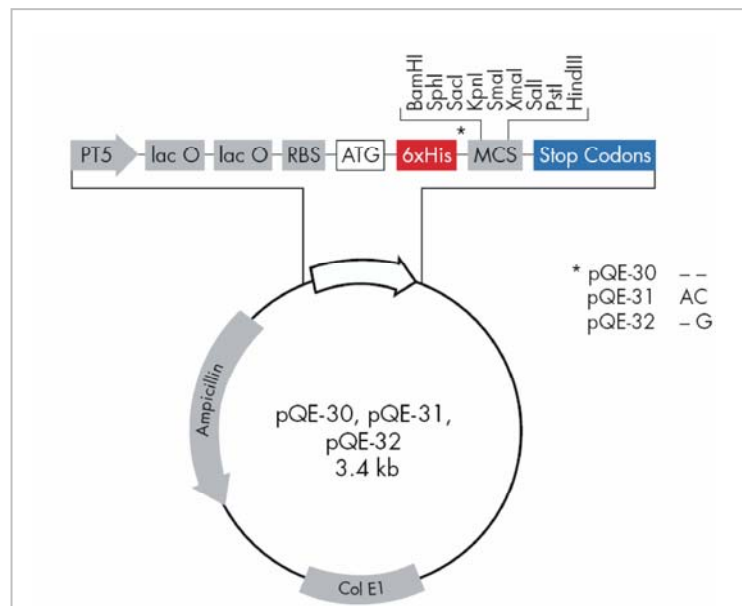
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (BioRad München)
Röntgen Fixierbad AL4	Kodak (Stuttgart)
Röntgenentwickler LX24	Kodak (Stuttgart)

**2.3. Antikörper****Tabelle 2: Antikörper.**

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Anti-VCC	1:5000	Zitzer <i>et al.</i> , 1993
Anti-Rabbit IG, biotinylated	1:1000	GE Healthcare
Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex	1:1000	GE Healthcare

**2.4. Plasmide**

Zur heterologen Produktion von ProVCC in *E. coli* M15 und Origami B-Zellen wurde der Expressionvektor pQE30 (Qiagen) verwendet, wodurch N-terminal sechs Histidinreste zur späteren Affinitätsreinigung eingeführt wurden.



**Abbildung 4: Expressionsvektor pQE-30Vektor (Qiagen).**

Der Expressionsvektor pQE-30 gehört zur pDS-Familie (Bujard et al., 1987) und enthält eine synthetische Ribosomenbindestelle (RBS), zwei *lac*-Operonsequenzen (*lac O*), eine multiple cloning site (MCS), einen T5-Promotor und eine für sechs aufeinander folgende Histidin-Reste kodierende Sequenz (6xHis) zur späteren Aufreinigung des Proteins.

## 2.5. Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert.

**Tabelle 3: Oligonukleotide.**

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Konstrukt
pQE30-BamHI-Sall	CGC GGA TCC GTC GAC AAT ATC AAT GAA CCA AGT GGT GAA GCG	
pQE30 taa PstI	GCA TCT GCA GAT TAG TTC AAA TCA AAT TGA ACC CCT TTC AC	
Q619C for	GGG TTA CAC ATG TGG GAA AAT G	C182A/C200A/ E322C/Q619C
Q619C rev	CAT TTT CCC ACA TGT GTA ACC C	C182A/C200A/ E322C/Q619C
Q629C for	GCG TGT GGG ATG TGA TCA TCG TTT G	C182A/C200A/ S311C/Q629C
Q629C rev	CAA ACG ATG ATC ACA TCC CAC ACG C	C182A/C200A/ S311C/Q629C
A601C for	GTA CCA TCA CCT GTT ATA CCG ATG	C182A/C200A/ G327C/A601C
A601C rev	CAT CGG TAT AAC AGG TGA TGG TAC	C182A/C200A/ G327C/A601C
Delta prism PstI	CGA TCT GCA GAT TAA AAC ACA TCG GTA TAA GCG GTG ATG G	$\Delta\beta$ -Prism $\Delta$ AS607-741
Delta Tref for	CAC CCA GTA TTC ACG GGT GGC CGC AAT GCG CAA GAA AGT TCG	$\Delta\beta$ -Trefoil $\Delta$ AS458-606

Delta Tref rev	CGA ACT TTC TTG CGC ATT GCG GCC ACC CGT GAA TAC TGG GTG	$\Delta\beta$ -Trefoil $\Delta$ AS458-606
TEV for	GAA AAT CTC TAT TTC CAA GGT AAT GCG CAA GAA AGT TCG CCG	TEV1 AS606:TEV:607
TEV rev	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC AAA CAC ATC GGT ATA AGC GG	TEV1 AS606:TEV:607
Tref2 for	GCC AAT ACG TGC GAT AGC AAT GCG CAA GAA AGT TCG CCG	$\Delta\beta$ -Trefoil2 $\Delta$ AS513-606
Tref2 rev	CGG CGA ACT TTC TTG CGC ATT GCT ATC GCA CGT ATT GGC	$\Delta\beta$ -Trefoil2 $\Delta$ AS513-606
TEV rev 2	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC GCG GCC ACC CGT GAA TAC TGG	TEV2 $\Delta$ AS485-606 AS485:TEV:606
TEV 3 for	GAA AAT CTC TAT TTC CAA GGTC CGGT CAAC CTAC AAC TTG CC	TEV3 AS484:TEV:485
TEV 3 rev	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC GCG GCC ACC CGT GAA TAC TGG	TEV3 AS484:TEV:485
TEV 4 for	GAA AAT CTC TAT TTC CAA GGT CAT CGT TTG TAT GTG CGA GCG	TEV4 AS630:TEV:631
TEV 4 rev	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC ATC TTG TCC CAC ACG CTG CTG	TEV4 AS630:TEV:631
TEV 5 for	GAA AAT CTC TAT TTC CAA GGT GAT ACC CCA CGT CGT CGA ATC	TEV5 AS457:TEV:458
TEV 5 rev	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC AAA GCC ATG GTA GGA TTG ATG	TEV5 AS457:TEV:458
TEV 6 for	GAA AAT CTC TAT TTC CAA GGT AGC GAA ACA AAT ACC TTG CCG	TEV6 $\Delta$ AS458-606 AS606:TEV:607
TEV 6 rev	ACC TTG GAA ATA GAG ATT TTC GTT TGC CGG TGC CGG ACT TGC	TEV6 $\Delta$ AS458-606 AS606:TEV:607
W376A for	CGT TCG ACC GAT GCT TTG GCG GTG AAT ACC TAC CCG GTA G	W387A/D642A/ Y679A/Y704A
W376A rev	CTA CCG GGT AGG TAT TCA CCG CCA AAG CAT CGG TCG AAC G	W387A/D642A/ Y679A/Y704A
D631A for	GCG AGC GGG TGC TGC CAT TGC GGC ATT AGG GTC CGC CTC CG	D642A/Y679A/Y704A
D631A rev	CGG AGG CGG ACC CTA ATG CCG CAA TGG CAG CAC CCG CTC GC	D642A/Y679A/Y704A
Y668A for	CTG GTG ATT TCC AAG CGG GCG GTC AGC AGT TGG TGG CGC TG	D642A/Y679A/Y704A
Y668A rev	CAG CGC CAC CAA CTG CTG ACC GCC CGC TTG GAA ATC ACC AG	D642A/Y679A/Y704A
Y693A for	CAA ACG GTA GGC TCG AAA GCG GCC GTC ACC AAT TGC CAT G	D642A/Y679A/Y704A
Y693A rev	CAT GAG CAT TGG TGA CGG CCG CTT TC GAG CCT ACC GTT TG	D642A/Y679A/Y704A



## 2.6. Kulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani; Sambrook et al., 1989) wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl

## 2.7. Verwendete Antibiotika

**Tabelle 4: Antibiotika und die verwendeten Konzentrationen.**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml

## 2.8. Bakterienstämme

*E. coli* M15[pREP4] (Zamenhof & Villarejo, 1972)

Charakteristika: *nalsS*, *strS*, *rifS*, *thi*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, *ara*<sup>-</sup>, *gal*<sup>-</sup>, *mtl*<sup>-</sup>, *F*<sup>-</sup>, *recA*<sup>+</sup>, *uvr*<sup>+</sup>, *lon*<sup>+</sup>

*E. coli* TOP10F<sup>'</sup> (Invitrogen)

Charakteristika: *F*{*tet*<sup>r</sup>}, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*,  $\Delta$ *lacX74deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Origami B (Novagen)

Charakteristika: *F*<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*<sub>B</sub>(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup> *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>) *gal dcm lacY1 ahpC gor522::Tn10 trxB* (Kan<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)

## 2.9. Eukaryontische Zelllinien

HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen sind nicht-viral transformierte humane Keratinozyten (Boukamp et al., 1988), weisen im Wesentlichen die Eigenschaften basaler epidermaler Keratinozyten auf und besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung.

### 2.10. Zellkulturmedien

DMEM + GlutaMAX™-I	Gibco (Eggenstein)
FCS	Gibco (Eggenstein)
HBSS	Gibco (Eggenstein)

### 2.11. Standardlösungen und Puffer

**Tabelle 5: Standardlösungen und Puffer.**

10 x PBS	1,5 M NaCl; 0,03 M KCl; 80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,5
10 x TAE	0,4 M Tris; 25 mM NaAc; 10 mM EDTA pH 7,8
CAPS-Puffer	10 mM CAPS; 10 % Methanol; pH 11
10 x TBS	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 8

### 2.12. Kulturbedingungen *E. coli*

Die Flüssigkultivierung von *E. coli* wurde in LB-Medium und in Gegenwart der entsprechenden Antibiotika durchgeführt. Die Zellen wurden schüttelnd (160 rpm) bei 37°C inkubiert.

### 2.13. Allgemeine Kulturbedingungen HaCaT

Adhärente HaCaT-Zelllinien wurden im Zellkultur-Brutschrank bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in DMEM + 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptavidin kultiviert. Alle 3-5 Tage (bei 80-90 % Konfluenz) wurden adhärenente Zellen passagiert. Da HaCaT-Zellen eine besonders widerstandsfähige Zell-Matrix-Verbindung aufbauen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, im Anschluss mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf Kulturflaschen (250 ml) verteilt.

### 2.14. Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA zur schnellen Analyse von *E. coli*-Klonen wurde das Plasmid Mini Kit (Qiagen) laut Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen) laut Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.15. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (M15) erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode (Hanahan, 1983). 100 ml LB-Medium wurden 1:200 mit der Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 schüttelnd bei 37°C kultiviert und 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm wurden die Zellen 15 Minuten sedimentiert, das Pellet in 20 ml kaltem RF1-Puffer (100 mM RbCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM KAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und 1 bis 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (4000 rpm, 20 Minuten, 4°C) und das Pellet in 4 ml RF2-Puffer (10 mM RbCl<sub>2</sub>; 10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin; pH 5,8) aufgenommen, 15 Minuten auf Eis inkubiert, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

### **2.16. *in-vitro* Mutagenese**

#### **2.16.1. Konstruktion von Aminosäuresubstitutions-Varianten**

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 3) wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Zur Konstruktion der Doppelcystein-Derivate wurden bereits beschriebene Einzelcystein-Varianten (Valeva et al., 2005) als Template verwendet, die auf der Basis von C182A/C200A erstellt wurden. Um eine weitere Punktmutation einzuführen, wurde ein Primer konstruiert, der die einzuführende Mutation enthält (FOR) und ein dazu komplementärer Primer über denselben Bereich (REV). Beide Primer wurden in zwei getrennten Reaktionen (1. PCR) zusammen mit dem flankierenden Oligonukleotiden pQE30 BamHI Sall (REV) bzw. pQE30 taa PstI (FOR) eingesetzt und die amplifizierten PCR-Fragmente gereinigt. Beide Fragmente mit der gewünschten Mutation wurden in äquimolarem Verhältnis für die zweite so genannte Kombi-PCR eingesetzt, wobei die komplementären Bereiche der beiden Fragmente hybridisierten, und mittels der beiden flankierenden Primer das mutierte Konstrukt amplifiziert wurde.

### 2.16.2. Konstruktion von Deletions-Konstrukten

Die zur Generierung verschiedener verkürzter VCC-Derivate verwendeten Oligonukleotide wurden ebenfalls von der Firma MWG Biotech bezogen und in Tabelle 3 aufgelistet. Um gezielte Bereiche innerhalb des Proteins zu deletieren, wurden Primer konstruiert, die sowohl komplementäre Sequenzen zum Bereich vor, sowie nach dem zu deletierenden Abschnitt besitzen. In zwei separaten PCR-Reaktionen (1. PCR) wurden zunächst zwei überlappende Fragmente mit der eingeführten Deletion synthetisiert. Für die Kombi-PCR wurden die beiden gereinigten Fragmente in äquimolarem Verhältnis eingesetzt und der Genabschnitt mit der eingeführten Deletion durch die flankierenden Oligonukleotide synthetisiert.

### 2.17. PCR-Ansätze

**Tabelle 6: PCR-Ansätze.**

1. PCR	Kombi-PCR
10 µg DNA	2 µl PCR 1 und PCR 2
10 µl 10 x Pfu Turbo-Puffer	10 µl Pfu Turbo-Puffer
0,8 µl dNTPs (25 mM)	0,8 µl dNTPs (25 mM)
1 µl Pfu Turbo	1 µl Pfu Turbo
1 µl Vorwärts-Primer	1 µl Vorwärts-Primer
1 µl Rückwärts-Primer	1 µl Rückwärts-Primer
76,2 µl H <sub>2</sub> O	82,2 µl H <sub>2</sub> O

Die PCR-Reaktionen wurden mit folgendem PCR-Programm durchgeführt.

**Tabelle 7: PCR-Programm.**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	4	1
Denaturierung	94	1	30
Hybridisierung	50	1	
Elongation	72	12	
Elongation	72	12	1

### 2.18. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente sowie Plasmide nach ihrer Größe getrennt werden. Diese Methode wurde verwendet um DNA-Fragmente aufzureinigen, zur Kontrolle von PCR- und Restriktionsansätzen, sowie zum Abschätzen von Konzentrationen für spätere Ligationsansätze. Als Standard wurde der 1 kb DNA Ladder (Promega Corporation) verwendet. 1 x TAE-Puffer wurde mit 0,001 % Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Durch Kochen in der Mikrowelle von jeweils 50 ml 1 x TAE-Puffer mit 1 % Agarose wurde die Agarose in Lösung gebracht, auf etwa 55°C abgekühlt und in einer geeigneten Gießeinrichtung bei Raumtemperatur erstarren lassen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer mit 0,001 % Ethidiumbromid-Lösung bei 100 V für etwa 30 Minuten.

10 x TAE-Puffer: 0,4 M Tris; 25 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA; pH 7,8

4 x Agarose-Puffer: 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 50 % (v/v) Glycerin; 50 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung: 1 % (w/v) wäßrige Lösung; Konz. 10 mg/ml

### 2.19. Präparative PCR

Die Amplifikation und Modifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion nach Sambrook and Russel (2001) durchgeführt. Zur Extraktion und Reinigung der PCR-Produkte wurden die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eluiert.

### 2.20. Restriktionsspaltung und Ligation

Mittels Restriktionsendonukleasen wird doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen gespalten und kann im Anschluss mittels DNA-Ligase verknüpft werden. Alle Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Roche bezogen. Pro µg DNA wurde die entsprechende Menge an Puffer und 1-10 U des jeweiligen Restriktionsenzym

zugeben und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei der angegebenen Temperatur für 1 bis 2 Stunden. Um die Religation des Vektors zu verhindern, wurde der Ansatz nach der Spaltung weitere 30 Minuten mit Shrimp Alkalic Phosphatase (SAP) bei 37°C inkubiert. Um die DNA nach der Modifikation zu extrahieren, wurde 1/10 des Volumens 3 M KAc-Lösung pH 5,5 zugegeben, die Mischung mit 2,5 Volumen 96 %igem Ethanol versetzt und 30 Minuten bei -20°C gefällt. Um die DNA zu sedimentieren, wurde der Ansatz 30 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.21. Ligation und Transformation**

Die Verknüpfung des Vektors (pQE30) mit den einzelnen DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche). Das für die Ligation eingesetzte molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert betrug 1:5. Der Ansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* M15-Zellen transformiert. Die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Zum Ligationsansatz wurden 70 µl kompetenter Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitze-Schock eine Minute bei 42°C im Wasserbad, nach zwei Minuten Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, in 200 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.22. DNA-Analyse durch Agarosegelelektrophorese**

Zur weiteren Analyse wurde die Klone in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika überimpft, über Nacht inkubiert und die Plasmid-DNA isoliert. Zum schnelleren Nachweis richtiger Klone wurde eine zusätzliche Sali-Schnittstelle durch die PCR eingeführt, wodurch richtige Klone durch die Restriktionsendonuklease gespalten und mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden können.

### **2.23. DNA-Sequenzierung**

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen wurden von GENTERpreise (Mainz) durchgeführt.

## **2.24. Reinigung von Pro-VCC unter renaturierenden Bedingungen**

### **2.24.1. Heterologe Expression in *E.coli* M15-Zellen**

Zur heterologen Expression von ProVCC in *E. coli* M15-Zellen wurde das *hlyA*-Gen (*V. cholerae* O1 El Tor Strain 8731) durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) kloniert, wodurch das Toxin einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag erhält. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. 1 Liter LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) wurde 1:50 mit der ÜN-Kultur überimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (β-D-thiogalactopyranoside) induziert (3 mM Endkonzentration) und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd kultiviert. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall 9000rpm, 20 min) geerntet und das Pellet in 40 ml Lysis-Puffer (20 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; pH 8) aufgenommen. Nach Zugabe von Lysozym (30 Minuten bei Raumtemperatur) erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall (Branson Probe Sonifier 250) durch dreimaliges Beschallen für jeweils eine Minute (Duty Cycle 50%, Output 3). Durch Zentrifugation (Sorvall 13.000rpm, 20 min) wurde das Toxin in so genannten Inclusion bodies pelletiert und dreimal mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl; 300 mM NaCl; 2 % Triton X-100) gewaschen (Sorvall 13.000rpm, 20 min). Das Pellet wurde erneut solubilisiert (4 M Harnstoff; 20 mM Tris/HCl; 300 mM NaCl; pH 8), zentrifugiert, die Inclusion bodies in Puffer (8 M Harnstoff; 20 mM Tris/HCl; 300 mM NaCl; pH 8) solubilisiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.24.2. Affinitätsreinigung von His<sub>6</sub>-tag-Proteinen unter denaturierenden Bedingungen**

Die Reinigung des aus Inclusion bodies isolierten Fusionsproteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen über eine Sepharose FF-Säule (Amersham) die mit Nickel-Chlorid präequilibriert und im Anschluss mit Puffer A (8 M Harnstoff; 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; pH 8) äquilibriert und der Rohextrakt aufgetragen (Flussrate 1 ml/min) wurde. Die Entfernung ungebundenen Toxins erfolgte mit Puffer B (8 M Harnstoff; 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; pH 6,3) und anschliessend wurde das Fusionsprotein mit Puffer C (8 M Harnstoff; 50 mM MES (Pufferan®) 500 mM NaCl) eluiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt, und die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden vereinigt und

bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Renaturierung wurde das Toxin 1:50 in Renaturierungspuffer (50 mM  $\beta$ -Methylcyclodextrin, 10 mM HEPES, pH 8) verdünnt und mittels Q-Sepharose (Amersham) konzentriert. Die Säule wurde mit Puffer E (10 mM Tris; 20 mM NaCl; pH 6,8) äquiliibriert, das Toxin aufgetragen und im Anschluss mit Puffer F (10 mM Tris; 300 mM NaCl; pH 7) von der Säule eluiert. Zur Aktivierung von ProVCC wurde das renaturierte mit  $1\mu\text{g/ml}$  Trypsin (Sigma) 15 Minuten auf Eis inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von  $10\mu\text{g/ml}$  Aprotinin (Sigma) gestoppt. Die Spaltung des Toxins wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

## **2.25. Reinigung von Pro-VCC unter nicht-renaturierenden Bedingungen**

### **2.25.1. Heterologe Expression in *E.coli* Origami B-Zellen**

Zur Expression löslichen Proteins wurden *E. coli* Origami B (Novagen) verwendet, die ein oxidierendes Cytoplasma besitzen, wodurch die Disulfidbrückenbildung unterstützt wird. Eine 20 ml Kultur (LB-Medium mit  $50\mu\text{g/ml}$  Ampicillin,  $25\mu\text{g/ml}$  Kanamycin und  $12,5\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin) wurde über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert und 1:50 in 1 Liter LB-Medium verdünnt. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd bis zu einer Absorbtion ( $A_{600\text{ nm}}$ ) von 0,6-0,8 inkubiert. Die VCC-Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG ( $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) und Induktion über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (9000 rpm, 10 Minuten) pelletiert und in 40 ml Puffer 1 (20 mM Tris/HCl pH8; 150 mM NaCl; 1mg Pefabloc (Roche);  $100\mu\text{l}$  Pefabloc Protector Solution; 1mg DNase, Lysozym) aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (Branson Probe Sonifier 250) durch dreimaliges Beschallen für jeweils eine Minute (Duty Cycle 50%, Output 3) und der Rohextrakt im Anschluss zentrifugiert (14.000 rpm, 20 Minuten). Der Überstand wurde sofort mit 20 mM Imidazol versetzt.

### **2.25.2. Affinitätsreinigung von löslichem His<sub>6</sub>-tag-ProVCC in Origami B-Zellen**

Die Reinigung erfolgte über eine Sepharose FF-Säule (Amersham) die mit Nickel-Chlorid prääquiliibriert und mit 20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl äquiliibriert wurde. Nach dem Auftrag des Toxins auf die Säule wurde diese mit 20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazol gewaschen und das Toxin mit 300 mM Imidazol eluiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen (1 ml) wurde bestimmt und die Fraktionen mit der höchsten Konzentration zusammengeführt, 1:1 mit Glycerin versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.



### 2.26. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay (BioRad, München) gemäß den Angaben des Herstellers durch spektralphotometrische Analyse bei 595 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Eichreihe aus verschiedenen Konzentrationen des Standardproteins BSA (*Bovine serum albumin*). Die Bio-Rad-Lösung wurde 1:5 in bidest. Wasser verdünnt und jeweils 10 µl des Proteingemisches mit 1 ml der verdünnten Lösung bei RT 5 Minuten inkubiert. Die Proben wurden in einem Photometer (Genesys 10UV Scanning) bei 595 nm gemessen und die enthaltene Proteinmenge mit Hilfe der Eichkurve abgeschätzt.

### 2.27. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Gelelektrophorese werden gereinigte Proteine oder Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und wenn angegeben 3 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 150 V und im Anschluss wurden die Gele 10-15 Minuten in Färbe-Lösung schüttelnd inkubiert oder zur immunologischen Detektion mit Antikörpern auf Nitrocellulose-Membranen übertragen.

4 x SDS-Probenpuffer: 10 % (w/v) SDS; 10 % (w/v) Saccharose; 20 % (w/v) Bromphenolblau; 100 mM Tris/HCl pH 7,4

Färbe-Lösung: 45 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Eisessig; 0,25 % (w/v); Coomassie Blue R-250

Entfärbe-Lösung: 7,5 % (v/v) Eisessig; 5 % (v/v) Isopropanol

**Tabelle 8: Zusammensetzung von SDS-Gelen.**

Trenngel	7,5 % [µl pro Gel]	10 % [µl pro Gel]	Sammelgel	[µl pro Gel]
Aqua dest.	2700	2000	Aqua dest.	1000
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1250	1250	0,5 M Tris/HCl pH 8,8	417
30 % Acrylamid-Mix	1250	1670	30 % Acrylamid-Mix	233
20 % SDS	25	25	20 % SDS	8
10 % APS	25	25	10 % APS	8
TEMED	5	5	TEMED	5

### 2.28. Western-Blot Analyse und immunologische Detektion mit Antikörper

Nach der Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und somit immobilisiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in CAPS-Puffer bei 200 mA für 1 h. Mittels spezifischer Antikörper wurden die Proteine nach dem Transfer detektiert und durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Um unspezifische Antikörperreaktionen mit der Membran zu verhindern, wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht in Blocking-Lösung schüttelnd bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (15 Minuten) mit TBST, erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper schüttelnd 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde die Membran schüttelnd mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit dem peroxidasekonjugierten Antikörper für 30 min bei RT, wurde die Membran 1 Stunde mit TBS gewaschen, wobei der Puffer nach je 15 Minuten gewechselt wurde. Zur Detektion wurde BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche) und Fuji Medical X-Ray Film Super RX-Filme (Fujifilm) verwendet.

CAPS-Puffer: 10 mM CAPS; 10 % Methanol; pH 11

10 x TBS: 100 mM Tris; 1,5 M NaCl, pH 8

1 x TBST: 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20; pH8

Blocking-Lösung: 5 % (w/v) Magermilch in 1 x TBST

### 2.29. Spaltung durch Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease

Mittels PCR wurde die Erkennungssequenz ENLYFQG an den entsprechenden Stellen eingefügt, die Proteine unter renaturierenden Bedingungen gereinigt und mittels Cyclodextrin renaturiert. Die Spaltung der rekombinanten Proteine erfolgte für 4 Stunden oder über Nacht bei 30°C. Je Ansatz (500 µl) wurden 50 µg Toxin mit 30 µl 20 x TEV-Puffer und 25 µl TEV-Protease (Invitrogen) inkubiert.

## **2.30. Hämolysen**

### **2.30.1. Gewinnung und Aufbereitung von Kaninchen Erythrozyten**

Die hämolytische Wirkung von VCC wurde an Kaninchen-Erythrozyten bestimmt, welche vom Tierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt wurden. Die Erythrozyten wurden zur Aufbereitung mehrmals mit PBS gewaschen, mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt und maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

### **2.30.2. Bestimmung der hämolytischen Wirkung von *Vibrio cholerae* Cytolysin**

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde eine Verdünnungsreihe des Toxins in PBS erstellt, Kaninchen Erythrozyten ( $10^8$  Zellen/ml in PBS) zugegeben und die Ansätze bei 37°C inkubiert. Die Absorption des freigesetzten Hämoglobins in den Überstand wurde bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen. Zur Auswertung wurde die jeweilige Kontrolle (Kaninchen-Erythrozyten in PBS) abgezogen und die prozentuale Hämolysen, bezogen auf die maximale Hämolysen mit aqua bidest, berechnet.

### **2.30.3. Osmotischer Schutz**

Zur Durchführung der osmotischen Schutz-Versuche wurden Kaninchen Erythrozyten in PBS mit und ohne 30 mM Dextran aufgenommen, mit aktiviertem G325C\*-Toxin allein oder einer äquimolaren Mischung aus G325C\* und G327C/A601C\* gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden geteilt, die Kaninchen-Erythrozyten bei 2000 rpm pelletiert und ungebundenes Toxin mit dem Überstand entfernt. Die Zellen wurden in PBS mit und ohne 100 mM Maltotriose aufgenommen, die Ansätze erneut zentrifugiert und die Freisetzung von Hämoglobin durch Messen der Absorption der Überstände bei 414 nm bestimmt.

Zusätzlich wurde die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität des Wild-Typs und G327C/A601C\* in verschiedenen Verhältnissen in PBS bzw. PBS ergänzt mit Maltotriose oder Sucrose bestimmt. Der molekulare Durchmesser von Maltotriose und Sucrose beträgt 1,2 bzw. 0,9 nm. Wild-Typ Toxin und G327C/A601C\* wurden durch Trypsin aktiviert, in verschiedenen Verhältnissen gemischt, wobei die Gesamtoxinkonzentration konstant 0,75 µg betrug, und im Anschluss 1:1 in PBS austitriert. Kaninchen-Erythrozyten wurden in PBS oder

PBS mit 80 mM Sucrose oder Maltotriose gemischt (5% Endkonzentration) und mit dem gleichen Volumen des Toxingemisches 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Absorption der Überstände wurde bei 414 nm bestimmt.

### **2.31. Gewinnung von Kaninchen Erythrozyten Ghosts**

Kaninchen Erythrozyten Ghosts wurden nach einem bereits beschrieben (Valeva et al., 2005; Valeva et al., 2008) allerdings leicht modifizierten Protokoll präpariert. Die Isolierung von Kaninchen-Erythrozyten Ghosts erfolgte aus 10-15 ml frisch-Blut, das dreimal mit PBS gewaschen wurde und die Zellen im Anschluss durch 5 mM Phosphat-Puffer pH 8 osmotisch lysiert wurden. Die Membranen wurden durch Zentrifugation bei 13,000 rpm für 20 min pelletiert und mehrmals mit 5 mM Phosphat-Puffer bzw. PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Im Anschluss wurden die Membranen in 1 ml PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.32. Oligomerisierung von VCC und Cross-Linking Assay auf Membranen**

Die aktivierten Doppelcystein-Derivate sowie C182A/C200A (5µg) wurden mit und ohne 5 mM DTT 15 min bei RT inkubiert und nach der Zugabe konzentrierter Ghosts ( $10^9$  Zellen/ml) 1 h bei 37°C 800 rpm inkubiert. Nach dreimaliger Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) zum Entfernen des ungebundenen Toxins, wurde das Pellet in PBS mit oder ohne 1 mM BS<sup>3</sup> (bis[sulfosuccinimidyl]suberate; Pierce Biotechnology) resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris/HCl pH 8 (150 mM Endkonzentration) gestoppt, 15 Minuten bei RT inkubiert, die Ansätze zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte durch Western-Blot Analysen mit anti-VCC Antikörpern.

### **2.33. Chemische Modifikation freier Sulfhydryl-Gruppen**

Die Modifikation freier SH-Gruppen wurde wie bereits beschrieben (Valeva et al., 1996) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Pro-Toxin in 8 M Harnstoff, 50 mM MES, 500 mM NaCl, pH 8 wurde mit einem 5-fachen Überschuss des jeweiligen Reagenz 1 h dunkel inkubiert und im Anschluss das ungebundene Reagenz über eine PD-10 Säule

(Pharmacia) abgetrennt. Das Toxin wurde wie bereits beschrieben renaturiert und falls angegeben durch Trypsin aktiviert.

### **2.34. Modifikation der freien Sulfhydryl-Gruppen mit [<sup>3</sup>H]-NEM**

Die heterolog in *E. coli* Origami B Zellen exprimierten Proteine wurden in PBS verdünnt (100 µg/ml) und mit 50 µCi 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe eines Überschusses an NEM (5 mM, 1 Stunde bei RT) vervollständigt und durch Zugabe von DTT (5 mM) gestoppt. Zum Entfernen der ungebundenen Reagenz wurde das markierte Toxin mittels Gelfiltration über eine PD-10 Säule gereinigt und in PBS aufgenommen. Sowohl der Einbau als auch das Entfernen des ungebundenen [<sup>3</sup>H]-NEM wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers abgeschätzt. Die spezifische Aktivität betrug zwischen 300 mCi/mmol Toxin und 1,2 Ci/mmol Toxin. Die Proben wurden mit Glycerin (50 %) versetzt und bei -20°C gelagert.

### **2.35. Bindung von *Vibrio cholerae* Cytolysin an Membranen**

#### **2.35.1. Abschätzen der Bindung von *Vibrio cholerae* Cytolysin an Kaninchen Erythrozyten mittels Western-Blot Analysen**

Um die Bindung der Doppelcystein-Derivate an Membranen zu untersuchen, wurden die Toxine mit Trypsin aktiviert und auf Eis mit Kaninchen Erythrozyten (10<sup>9</sup> Zellen/ml) inkubiert. Bei der Inkubation von VCC mit Kaninchen Erythrozyten bei 4°C wurde VCC bislang lediglich in der monomeren Form mittels Western-Blot Analysen nachgewiesen und nach der Solubilisierung mit Natrium-Desoxycholat eluierte nur monomeres Toxin von einer Superdex 200 HR Säule (Zitzer et al., 1997). Auch die Verwendung von Cross-Linkern ermöglichte keinen Nachweis SDS-labiler Oligomere (Zitzer et al., 2002). Nach der Inkubation von VCC mit Kaninchen Erythrozyten bei 4°C, Daher ist anzunehmen, dass VCC unter diesen Bedingungen bindet, aber nicht oligomerisiert und damit lediglich die Bindung untersucht werden kann. Durch Zentrifugation bei 4°C (13.000rpm, 10 min) wurde das ungebundene Toxin (Überstand) entfernt und zur weiteren Analyse mit SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde mehrmals mit Phosphatpuffer gewaschen und in Anschluss in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Menge an Toxin wurde durch Western-Blot mit anti-VCC Antikörpern analysiert.

### **2.35.2. Bindung Fluoreszein-markierter Toxine an Kaninchen Ghosts**

Die Bindung des Fluoreszein-markierten Pro-Toxins erfolgte in Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  TAPI-0 (Metalloprotease Inhibitor TNF- $\alpha$  protease Inhibitor), um die spontane Spaltung während der Inkubation mit Kaninchen Erythrozyten Ghosts zu verhindern (Valeva et al., 2004). Zur Bindung des aktivierten Toxins wurde das Toxin wie bereits beschrieben mit Trypsin gespalten. Je 25  $\mu\text{g}$  Toxin wurden 1 h bei 4°C und 800 rpm mit 100  $\mu\text{l}$  Kaninchen Ghosts ( $10^9$  Zellen/ml) inkubiert und im Anschluss 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um das ungebundene Toxin mit dem Überstand zu entfernen. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBS wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren des gebundenen Toxins mit einem SPEX Fluoromax Spektrofluorometer aufgenommen. Um die Menge an gebundenem Toxin abschätzen zu können, wurden die Spektren des Toxins in Lösung, nach der Bindung an Membranen (Pellet) und des ungebundenen Toxins (Überstand) aufgenommen. Die Bindung der Toxine wurde aus der Menge des gebundenen Toxins im Vergleich zum ungebundenen Toxin abgeschätzt und stimmte mit den gemessenen Spektren in Lösung überein. Aufgetragen wurde relative Bindung im Vergleich zum Wild-Typ Toxin.

### **2.35.3. Bindung radioaktiv-markierter Toxine an Kaninchen Erythrozyten**

Verschiedene Mengen an radioaktiv-markiertem Toxin (siehe Ergebnisteil) wurden in 500  $\mu\text{l}$  PBS verdünnt, falls angegeben mit Trypsin aktiviert, und mit und ohne 25  $\mu\text{l}$  konzentrierter Kaninchen Erythrozyten 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (2000 rpm, 10 Minuten, 4°C), der Überstand abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Pellet-assoziierte Radioaktivität wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers untersucht und zusätzlich die Radioaktivität der Toxine in Lösung sowie des Überstandes abgeschätzt.

### **2.36. Co-Oligomerisierung von aktivem Toxin mit G327C/A601C\***

Um eine mögliche Interaktion zwischen aktivem und arretiertem Toxin zu untersuchen, wurde C182A/C200A/G325C spezifisch an der freien Sulfhydryl-Gruppe mit dem umgebungssensitiven Fluorophor Acrylodan markiert, um sowohl die Analyse durch SDS-PAGE (UV-Transilluminierung) als auch durch Spektrofluorometrie zu ermöglichen. Eine konstante Menge des Acrylodan-markierten Toxins (10  $\mu\text{g}$ ) wurde mit steigender Menge des

Doppelcystein-Derivats vorinkubiert und anschließend mit Ghosts 1h bei 37°C inkubiert. Die Membranen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundenes Toxin zu entfernen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch UV-Transillumination und SDS-PAGE analysiert. Zusätzlich wurden Fluoreszenz Emissionsspektren der einzelnen Mischungen sowie des markierten Toxins in Lösung aufgenommen.

### **2.37. Messung intrazellulären ATPs**

Zur Bestimmung des intrazellulären ATPs wurden HaCaT-Zellen in einer Zelldichte von 6 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in 96 Well-Platten (Nunc) ausgesät und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit vorverdünntem Toxin (ng-mg) oder Medium wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 1% Triton X-100 aufgenommen um die Menge an intrazellulärem ATP durch das ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche) gemessen.

### **2.38. Computergestützte Methoden**

Der in Abbildung 27 dargestellte Sequenzvergleich der Aminosäure-Sequenzen von *Vibrio cholerae* Cytolysin (X51746) und *Vibrio fluvialis* Hämolysin (AF348455) wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt und durch Boxshade dargestellt.

Die Darstellung der Strukturen in Abbildung 3 erfolgte mit Protein Workshop.

Internet-Adressen: <http://www.ebi.ac.uk/Tool/clustalw2/index.html>  
[http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)  
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Nachweis der Prä-Pore als Zwischenstufe der Porenbildung von *Vibrio cholerae* Cytolysin

Für  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*, das große strukturelle Ähnlichkeit mit VCC besitzt, wurde die Porenbildung bereits im Detail charakterisiert (Valeva et al., 1997, Walker et al., 1992). Die Oligomerisierung zu einer insertionskompetenten nicht-lytischen Struktur auf der Membran, der Prä-Pore, stellt eine verbreitete Zwischenstufe der Porenbildung dar, die im Gegensatz zu  $\alpha$ -Toxin für VCC bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte. In den folgenden Versuchen sollte der Mechanismus der Porenbildung für VCC näher charakterisiert und ein mögliches Prä-Poren Stadium nachgewiesen werden.

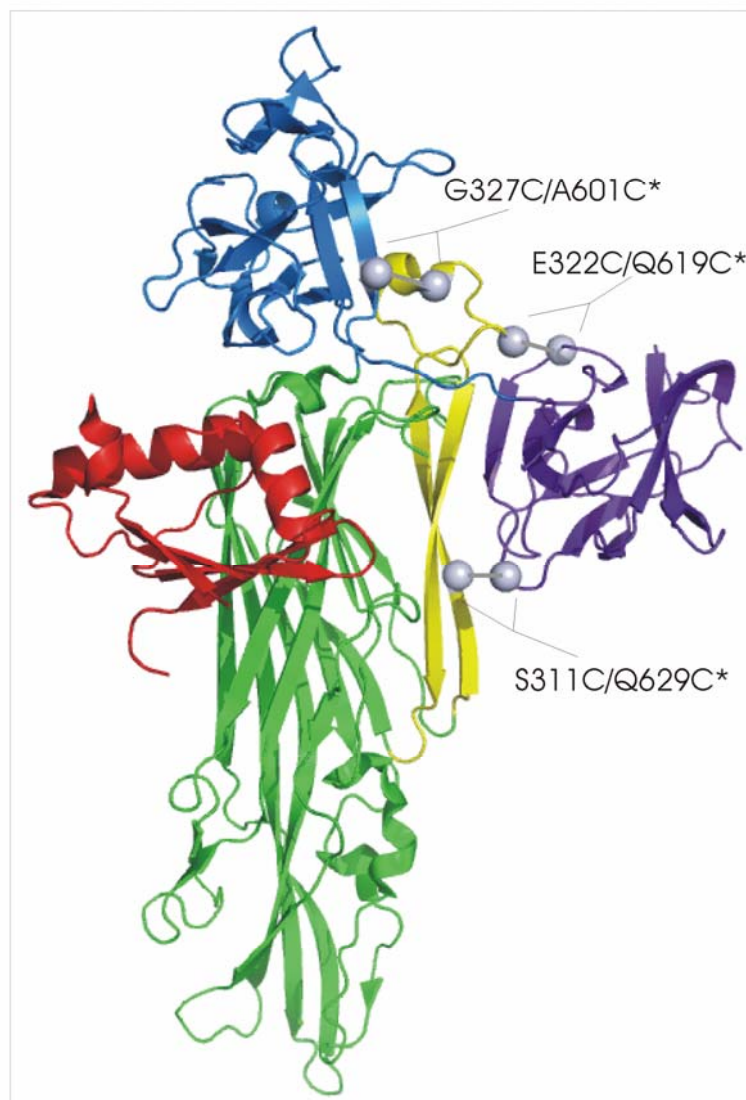
##### 3.1.1. Konstruktion von VCC-Doppelcystein-Derivaten

Der molekulare Mechanismus der Oligomerisierung und Insertion ist bislang wenig verstanden, da Intermediärstadien nur schwer nachzuweisen sind. Eine Möglichkeit, um strukturelle Informationen über kurzlebigen Zwischenstadien zu erhalten, ist die Unterbrechung der Porenbildung an bestimmten Stadien. Die Einführung intramolekularer Disulfidbrücken ermöglicht ein gezieltes An- und Ausschalten des Prozesses, wodurch die Porenbildung nicht verhindert, sondern lediglich unterbrochen wird. Die Oligomerisierung des VCC-Monomers erfordert die Reposition der  $\beta$ -Prism-Domäne, die sich an der Grenze des zweiten  $\beta$ -Strangs des Pre-Stems befindet. Erst durch diese Bewegung der Lektin-ähnlichen Domäne kann die Insertion der porenbildenden Sequenz in die Membran erfolgen. Daher wurden Doppelcystein-Derivate konstruiert, die jeweils einen Cystein-Rest in der porenbildenden Sequenz und der  $\beta$ -Prism- bzw.  $\beta$ -Trefoil-Domäne enthalten. Erfolgt die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cystein-Resten, wird die Insertion der Pre-Stem Sequenz in die Membran verhindert und das Toxin ist inaktiv. Die anschließende Reduktion der Disulfidbrücke ermöglicht die Reposition, und es kommt zur Insertion und Porenbildung.

*Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) enthält sechs Cystein-Reste an den Positionen C182, C200, C497, C511, C537 und C549. Lediglich zwei dieser Cystein-Reste (C182 und C200) liegen als freie Sulfhydryl-Gruppen vor, die verbleibenden vier Cystein-Reste konnten als Disulfidbrücken im VCC-Molekül identifiziert werden (Valeva et al., 2005). Für die



Konstruktion der Doppelcystein-Derivate wurde daher das aktive C182A/C200A-Konstrukt, in dieser Arbeit als Wt\* bezeichnet, ohne freie Cysteine als Matrize verwendet (Valeva et al., 2005). Aufgrund der Kristallstruktur des VCC-Monomers wurden vier Doppelcystein-Derivate, C182A/C200A/V310C/Q629C, C182A/C200A/S311C/Q629C, C182A/C200A/E322C/Q619C und C182A/C200A/G327C/A601C, generiert, wobei in dieser Arbeit lediglich drei dieser Toxine näher charakterisiert wurden. Die verwendeten Proteine werden zur Vereinfachung im Folgenden als S311C/Q629C\*, E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* bezeichnet. Die Position dieser Mutationsstellen ist in Abbildung 5 dargestellt.



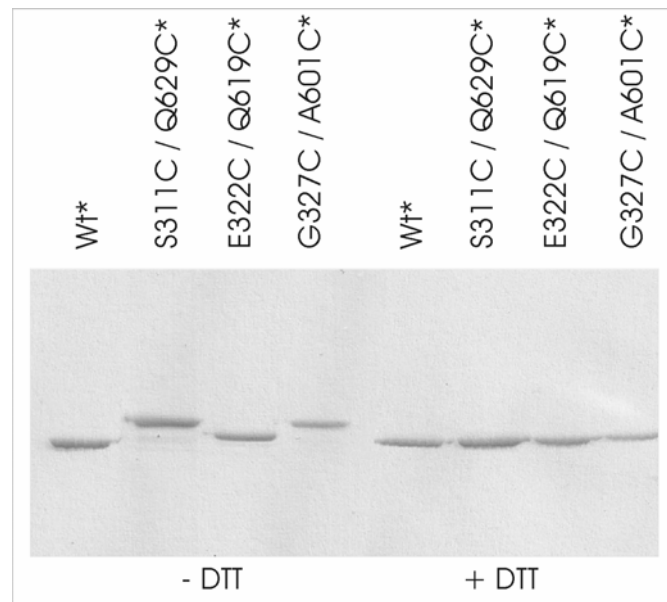
**Abbildung 5: Position der Mutationsstellen im VCC-Molekül.**

Die Lokalisation der mutierten Aminosäuren ist in der Ribbon-Präsentation der Kristallstruktur des VCC-Monomers dargestellt. Die Pro-Domäne, die vor der Oligomerisierung proteolytisch gespalten werden muss, ist in rot dargestellt, der cytolytische Kern in grün, β-Trefoil und β-Prism in blau bzw. violett. Die membraninserierende Sequenz ist in gelb hervorgehoben.

### 3.1.2. Reinigung der Doppelcystein-Derivate

Alle VCC-Derivate wurden heterolog in *E. coli* M15 exprimiert und die Proteine affinitätschromatografisch gereinigt. Die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken wurde durch die Zugabe von Diamid (diazenedicarboxylic acid bis(N,N'-dimethylamide) induziert. Diamid ist ein kleines Oxidationsmittel, das gezielt an Proteine mit freien Sulfhydryl-Gruppen bindet und über die Zwischenstufe eines Thiol-Diamids die Bildung von Disulfidbrücken katalysiert.

Die verschiedenen VCC-Derivate, sowie der Wt\*, wurden mittels SDS-PAGE (Abbildung 6) analysiert.



**Abbildung 6: SDS-Page der gereinigten VCC-Derivate mit und ohne DTT.**

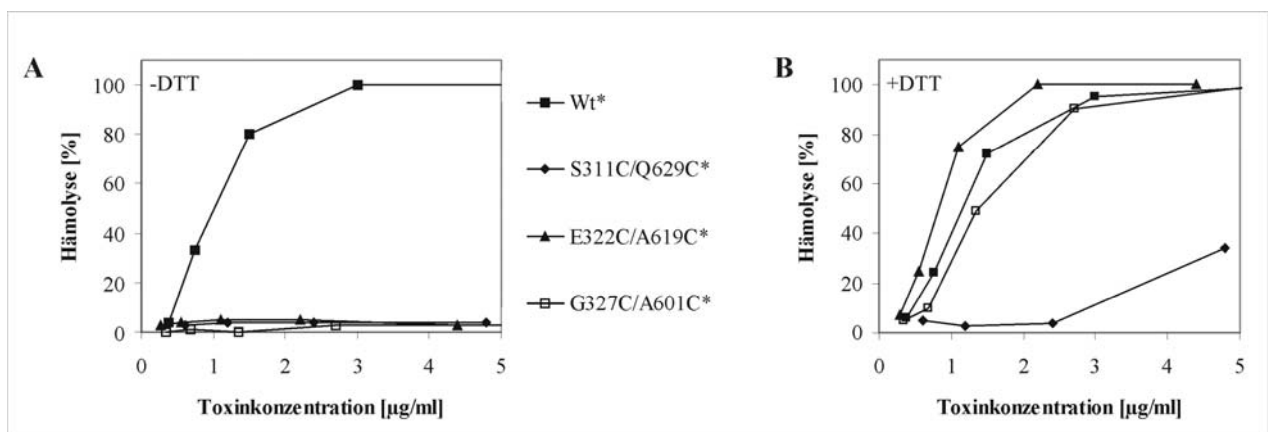
Rekombinante Proteine wurden mittels Affinitätschromatografie gereinigt und jeweils 5 µg in An- und Abwesenheit von 5 mM DTT mittels SDS-PAGE analysiert. Zuerst wurden die Toxine (Wt\*, S311C/Q629C\*, E322C/Q619C\* und G327C/A601C\*) unter oxidierenden Bedingungen (-DTT) danach unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) aufgetragen. Alle Proben wurden 3 Minuten bei 95°C erhitzt.

Das Laufverhalten aller drei VCC-Derivate im SDS-Gel wurde nach der Reaktion mit Diamid im Vergleich zum Wt\* verlangsamt, konnte aber durch die Reduktion der Disulfidbrücke mittels DTT normalisiert werden. Die Mobilität des Wt\*-Toxin im SDS-Gel ist unter reduzierenden sowie oxidierenden Bedingungen vergleichbar. Obwohl durch die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken die Geschwindigkeit von Proteinen aufgrund der kompakteren Struktur im SDS-Gel oft erhöht wurde (Kawate et al., 2003), war dies bei den

VCC-Derivaten nicht zu beobachten. Das veränderte Laufverhalten der Doppelcystein-Derivate deutet dennoch darauf hin, dass die Toxine als Monomere vorliegen, und sich zwischen den eingefügten Cystein-Resten Disulfidbrücken ausgebildet haben.

### 3.1.3. Hämolytische Charakterisierung der Doppelcystein-Derivate

Ein weiterer Hinweis für die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken, und die damit verbundene Unterbrechung der Porenbildung, ist die Inaktivität der einzelnen Toxine unter oxidierenden Bedingungen. Um die hämolytische Aktivität der VCC-Derivate zu untersuchen, wurden die Toxine mit Kaninchen-Erythrozyten in An- und Abwesenheit von DTT inkubiert, eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt und die Absorption des Überstandes bei 414 nm als Maß für die Freisetzung von Hämoglobin bestimmt.



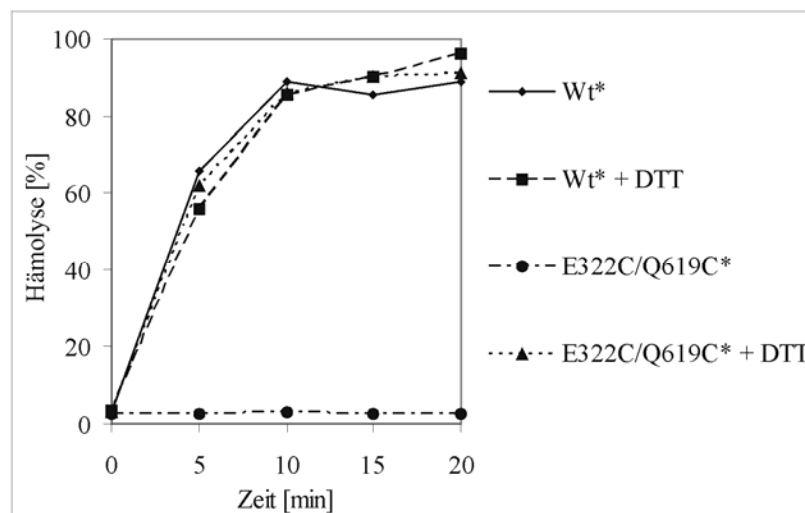
**Abbildung 7: Vergleich der konzentrationsabhängigen hämolytischen Aktivität der Doppelcystein-Derivate mit und ohne DTT.**

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden Kaninchen-Erythrozyten mit aktiviertem Toxin 1 Stunde bei 37°C in An- und Abwesenheit von 5 mM DTT inkubiert und die Absorption des Überstandes bei 414 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse drei unabhängiger Versuche.

In Abbildung 7 ist die konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität der Doppelcystein-Derivate in An- und Abwesenheit von DTT, sowie im Vergleich zum Wt\*-Toxin aufgetragen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen sind alle VCC-Derivate, S311C/Q629C\*, E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* hämolytisch inaktiv. Lediglich der Wt\* zeigt erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Lyse der Erythrozyten. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken wird die hämolytische Aktivität von E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* komplett wiederhergestellt und ist vergleichbar mit der Aktivität des Wildtyps. S311C/Q629C\* hingegen zeigt eine deutlich reduzierte hämolytische Aktivität in

Anwesenheit von DTT. Das Fehlen der hämolytischen Aktivität unter oxidierenden Bedingungen deutet darauf hin, dass eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cystein-Resten entsteht und die Bildung einer lytischen Pore verhindert wird. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen ist eine im Vergleich zum Wt\*-Toxin uneingeschränkte hämolytische Aktivität der Doppelcystein-Derivate E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* zu beobachten, wodurch gezeigt wird, dass die Proteinstruktur dieser beiden Toxine durch die eingeführten Cystein-Reste nicht beeinträchtigt wird.

Um die hämolytische Wirkung der Doppelcystein-Derivate näher zu charakterisieren, wurde die hämolytische des Wt\*-Toxins und der Doppelcystein-Derivate in An- und Abwesenheit von DTT innerhalb der ersten 20 Minuten bestimmt. Exemplarisch für die beiden Doppelcystein-Derivate E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* ist in Abbildung 8 der Verlauf von E322C/Q619C\* dargestellt.



**Abbildung 8: Kinetik der hämolytischen Aktivität des Wt\* und E322C/Q619C\* mit und ohne DTT.**

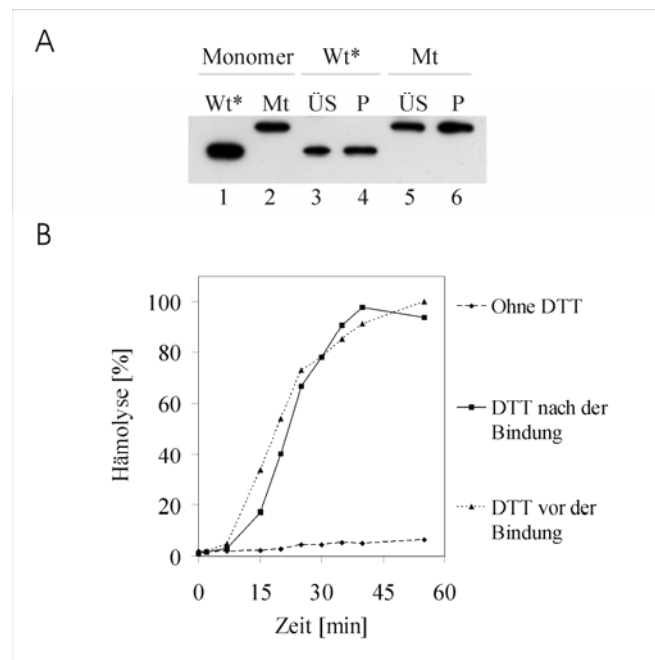
Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität über die Zeit wurde Wt\*-Toxin und E322C/Q619C\* (1,5 µg/ml) in An- und Abwesenheit von DTT mit Kaninchen-Erythrozyten bei 37°C inkubiert und Proben nach 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten genommen. Die Hämolyse wurde durch Messung des Überstandes bei 414 nm quantifiziert.

In Abbildung 8 ist der hämolytische Effekt des VCC-Derivates und des Wild-Typs auf Kaninchen-Erythrozyten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen innerhalb der ersten 20 Minuten dargestellt. Obwohl E322C/Q619C\* keine hämolytische Aktivität in Abwesenheit eines reduzierenden Agens besitzt, ist der Verlauf der Kurve nach Zugabe von DTT äquivalent zum Wild-Typ. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass E322C/Q619C\*

nach der Reduktion durch DTT die Struktur des Wild-Typs aufweist, wodurch das gleiche hämolytische Potential erreicht wird.

### 3.1.4. Untersuchungen zur Bindung der Doppelcystein-Derivate an Membranen

Neben der Bildung intramolekularer Disulfidbrücken, die zur Unterbrechung der Porenbildung führen, könnte die Inaktivität der VCC-Derivate auch auf einer verminderten Bindung des Toxins an Membranen beruhen. Um die Bindung der VCC-Derivate zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Charakterisierung des VCC-Derivates G327C/A601C\*.**

(A) Bindung des Wt\* (Spur 1) und G327C/A601C\* (Spur 2). Jeweils 5 µg Toxin wurde bei 4°C mit Kaninchen-Erythrozyten 1h inkubiert (500 µl Ansatz), die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und ungebundenes Toxin im Überstand (Spuren 3 und 5) entfernt. Das Pellet wurde dreimal mit Puffer gewaschen und in Puffer aufgenommen (Spuren 4 und 6). Im Anschluss wurde sowohl die Menge des ungebundenen Toxins (ÜS) als auch der Pellet-Fraktion (P) mittels Western-Blot und anti-VCC Antikörpern analysiert. (B) Hämolytische Aktivität von G327C/A601C\* ohne DTT sowie nach Zugabe von DTT vor und nach der Bindung. G327C/A601C\* wurde bei 4°C unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen an Kaninchen-Erythrozyten gebunden (1,5µg/ml), die Zellen zentrifugiert und das ungebundene Toxin mit dem Überstand entfernt. Die Zellen wurden dreimal gewaschen, in Puffer mit und ohne 5 mM DTT aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Die Hämolyse wurde durch Messung der Absorption des Überstandes bei 414 nm bestimmt.

Mittels Western-Blot Analysen sollte zunächst die Bindung im Vergleich zum Wt\* untersucht werden. Dazu wurden die Toxine mit Kaninchen-Erythrozyten auf Eis inkubiert. Unter diesen

Bedingungen bindet VCC an Membranen, und bislang konnten durch verschiedene Ansätze keine Oligomere bei 4°C nachgewiesen werden (Zitzer et al., 2000). Durch Zentrifugation wurden die Erythrozyten pelletiert und das ungebundene Toxin mit dem Überstand entfernt, die Zellen gewaschen und in Puffer aufgenommen. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde die Menge an ungebundenem und gebundenem Toxin analysiert. Aufgetragen wurden die Monomere in Lösung (Spuren 1 und 2) sowie der Überstand (Spuren 3 und 5) und das Pellet (Spuren 4 und 6). Wie in Abbildung 9A dargestellt, ist die Bindung der Doppelcystein-Derivate unter nicht-reduzierenden Bedingungen vergleichbar mit dem Wild-Typ.

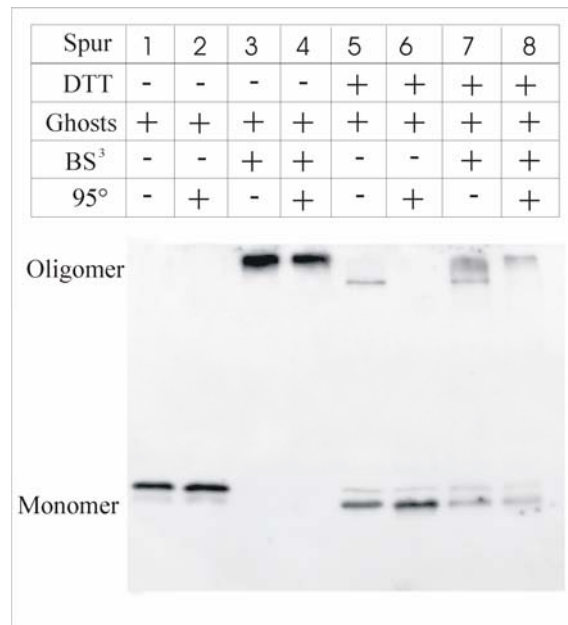
Um die Bindungsfähigkeit der VCC-Derivate weiterhin zu untersuchen, wurden die Toxine unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen bei 4°C an Kaninchen-Erythrozyten gebunden. Die mit nicht-reduziertem Toxin inkubierten Zellen wurden zentrifugiert, um ungebundenes Toxin zu entfernen, geteilt und in Puffer mit und ohne DTT aufgenommen. Alle Proben wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um Hämolyse zu erlauben. In Abbildung 9B ist der zeitliche Verlauf der Hämolyse von G327C/A601C\* ohne DTT, sowie mit DTT vor und nach der Bindung dargestellt. Die hämolytische Aktivität des VCC-Derivates ist unabhängig davon, ob die Reduktion durch DTT vor oder erst nach der Bindung erfolgt, demnach ist die Bindung des reduzierten und nicht reduzierten Toxins vergleichbar. Das nicht-reduzierte VCC-Derivat bleibt aber weiterhin hämolytisch inaktiv, obwohl die Bindung des Toxins nicht beeinflusst wurde.

Beide Experimente zeigen, dass die Einführung einer intramolekularen Disulfidbrücke die Bindungsfähigkeit der VCC-Derivate nicht beeinträchtigt und die funktionale Arretierung des Toxins erst nach der Bindung des Toxins an Membranen erfolgt.

### **3.1.5. Nachweis der Prä-Pore durch Cross-linking Experimente**

E322C/Q619C\* und G327C/A601C\* blieben unter oxidierenden Bedingungen hämolytisch inaktiv, erreichten aber Wt\*-Aktivität unter reduzierenden Bedingungen. Um zu untersuchen, ob die VCC-Derivate in Abwesenheit eines reduzierenden Agens als Monomer oder Oligomer auf Membranen vorliegen, wurden die Toxine mit Kaninchen-Erythrozyten inkubiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Exemplarisch für beide Doppelcystein-Derivate sind in Abbildung 10 die Ergebnisse für G327C/A601C\* dargestellt. In Anwesenheit eines reduzierenden Agens oligomerisiert das Toxin auf Membranen, und es kommt zur

Bildung SDS-stabiler Oligomere (Spur 5), die durch Erhitzen auf 95° zu monomerem Toxin zerfallen (Spur 6). Ohne reduzierendes Agens hingegen, ist nach der Inkubation mit Ghosts keine Oligomerbande zu beobachten (Spur 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass lediglich die reduzierte Doppelcystein-Derivate dazu in der Lage ist, SDS-stabile Oligomere auf Membranen zu bilden.



**Abbildung 10: Oligomerisierung von G327C/A601C\* unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen.**

Zur Analyse der Oligomerisierung unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde aktiviertes G327C/A601C\*-Toxin ohne (Spuren 1-4) und mit DTT (Spuren 5-8) bei Raumtemperatur 30 min vorinkubiert. Die Proteine wurden in An- (Spuren 3, 4, 7, 8) und Abwesenheit (Spuren 1, 2, 5, 6) des Cross-linkers BS<sup>3</sup> mit Kaninchen-Ghosts 1 h bei 37°C inkubiert, 3 Minuten bei 95°C erhitzt (Spuren 2, 4, 6, 8) und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Im Gegensatz zum reduzierten Toxin (Spur 5), bildet das Doppelcystein-Derivat unter nicht reduzierenden Bedingungen keine SDS-stabilen Oligomere (1). Nach Zugabe des Cross-linkers BS<sup>3</sup> können sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen Oligomere nachgewiesen werden.

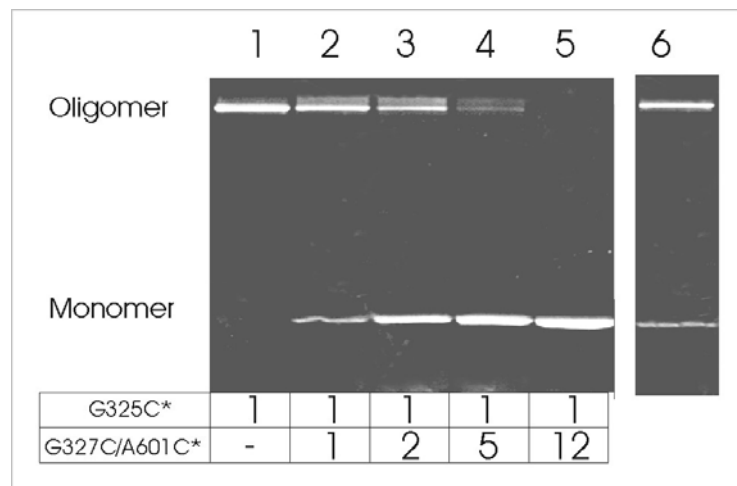
Um zu untersuchen, ob G327C/A601C\* unter nicht-reduzierenden Bedingungen SDS-labile Oligomere auf der Membran bildet, wurden Cross-linker verwendet, um mögliche SDS-labile Oligomere chemisch zu stabilisieren. Der hierfür verwendete homobifunktionelle Cross-linker BS<sup>3</sup> (bis[sulfosuccinimidyl]suberate) ist wasserlöslich und verfügt über einen 11,4 Å langen Spacer. BS<sup>3</sup> besitzt zwei reaktive Succinimidylester-Gruppen, die mit freien Aminogruppen reagieren, wodurch zwei Aminogruppen des Proteins kovalent miteinander verknüpft werden. Um SDS-labile Oligomere, und damit auch ein Prä-Poren Stadium, nachzuweisen, wurden das VCC-Derivat unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen an Membranen gebunden, ungebundenes Toxin entfernt, die Zellen in Puffer mit BS<sup>3</sup> aufgenommen und bei 37°C inkubiert, um die Oligomerisierung zu ermöglichen. Die Proben wurden mittels SDS-

PAGE und Western-Blot analysiert. Abbildung 10 zeigt, dass G327C/A601C\* unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Cross-linkers Oligomere bildet (Spur 7), diese jedoch durch BS<sup>3</sup> miteinander verknüpft wurden und wie erwartet nicht durch Erhitzen bei 95°C zu Monomeren dissoziieren. Die Oligomerisierung des Toxins ist demnach unabhängig von der Anwesenheit des Cross-linker. Im Gegensatz zu nativen Oligomeren (Spur 5), die aufgrund ihres denaturierten Zustandes ein schnelleres Laufverhalten zeigen, wandern die verknüpften Oligomere im SDS-Gel langsamer (Spur 7). Dieses veränderte Laufverhalten der Oligomere nach der Inkubation mit einem Cross-Linker wurde bereits früher, unter anderem auf Liposomen, gezeigt (Zitzer et al., 2000). Nach der Inkubation des gebundenen Toxins an Membranen mit BS<sup>3</sup> bei 37°C, sind auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen Oligomere zu beobachten, die nicht durch Erhitzen dissoziieren (Spuren 3 und 4). Im Gegensatz zum reduzierten VCC-Derivats, ist unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Gegenwart des Cross-linkers notwendig zur Bildung SDS-stabiler Oligomere. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Doppelcystein-Derivate auch ohne ein reduzierendes Agens auf Membranen oligomerisieren und SDS-labile Oligomere bilden.

### **3.1.6. Charakterisierung gemischter Oligomere bezüglich ihrer SDS-Stabilität**

Neben chemischen Cross-linking Experimenten wurde ein mögliches Präporen-Stadium durch weitere Methoden untersucht. Es wurde analysiert, ob die funktionell inaktiven Doppelcystein-Derivate mit aktivem Toxin assoziieren und gemischte Oligomere bilden können. Um diese Frage zu beantworten, wurde das funktionell aktive VCC-Derivat C182A/C200A/G325C, weiterhin als G325C\* bezeichnet, verwendet (Valeva et al., 1996). Aminosäure 325 ist in der porenbildenden Sequenz von VCC lokalisiert, interagiert direkt mit der Membran und kann über einen eingeführten Cystein-Rest mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die Oligomerisierung des funktionell aktiven Acrylodan-markierten Derivates in SDS-stabile Oligomere kann mittels UV-Transillumination von SDS-Gelen nachgewiesen werden. Zum Nachweis gemischter Oligomere, bestehend aus der Fluoreszenz-markiertem VCC-Derivat und den Doppelcystein-Konstrukten, wurde eine konstante Menge des Acrylodan-markierten Toxins G325C\* mit steigenden G327C/A601C\*-Konzentrationen inkubiert, an Membranen gebunden und mittels SDS-PAGE und UV-Transillumination analysiert (Abbildung 11).





**Abbildung 11: Co-Oligomerisierung des aktiven VCC-Derivats G325C\* mit G327C/A601C\*.**

Die Co-Oligomerisierung Acrylodan-markierten G325C\*-Toxins mit G327C/A601C\* wurde durch SDS-PAGE und UV-Transillumination analysiert. Eine konstante Menge an Acrylodan-markiertem G325C\*-Toxin wurde mit steigenden Konzentrationen G327C/A601C\* bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Zugabe von Kaninchen-Ghosts wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert, und die Oligomerisierung durch SDS-PAGE analysiert. G325C\* allein bildet SDS-stabile Oligomere (Spur 1). Mit steigenden Mengen des Doppelcystein-Derivats nimmt die Oligomerbande ab, während die untere Monomerbande an Intensität zunimmt (Spuren 2-5). Bei einem 12fachen Überschuss des G327C/A601C\*-Toxins (Spur 5) ist lediglich die untere Monomerbande zu beobachten, nach der Reduktion des membrangebundenen Toxins bei diesem Verhältnis mit DTT (Spur 6) hingegen werden SDS-stabile Oligomere gebildet.

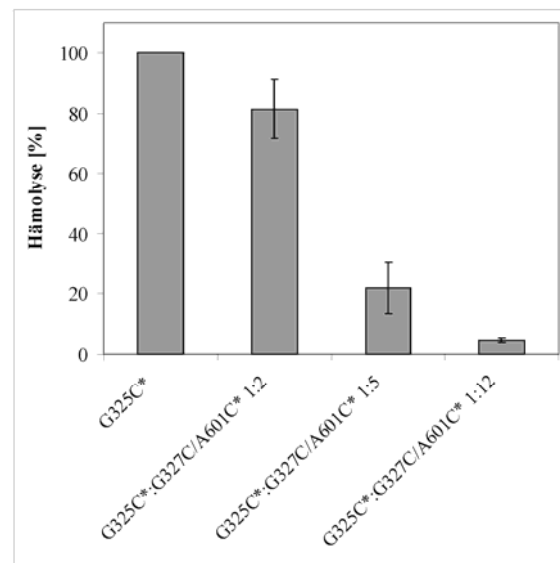
In Abbildung 11 ist die Bildung SDS-stabiler Oligomere durch Acrylodan-markiertes G325C\*-Toxin auf Membranen dargestellt (Spur 1). Durch Zugabe steigender Konzentrationen des Doppelcystein-Derivats (Spuren 2-5) wird die Menge SDS-resistenter Oligomere drastisch reduziert und die Monomer-Bande nimmt in entsprechendem Maß zu. Da das Doppelcystein-Derivat SDS-sensitive Oligomere auf Membranen bildet, überwiegt bei steigenden Konzentrationen der SDS-sensitive Phenotyp von G327C/A601C\*. Dieser Ergebnisse deuten darauf hin, dass gemischte Oligomere bestehend aus aktivem Toxin G325C\* und den Doppelcystein-Derivaten gebildet werden. Die Reduktion des Gemisches G325C\*:G327C/A601C\* 1:12 durch die Zugabe von DTT nach der Bindung an Membranen führt zur SDS-Stabilität der Oligomere, wodurch der Einbau von G325C\* in gemischte Oligomere gezeigt wird. Zusätzlich wird ausgeschlossen, dass G325C\* unter diesen Bedingungen als Monomer an Membranen bindet.

### 3.1.7. Charakterisierung der porenbildenden Aktivität gemischter Oligomere

Wie in Abbildung 11 dargestellt, nimmt die SDS-Stabilität der Hybridoligomere, bestehend aus G325C\* und dem Doppelcystein-Derivat, mit steigenden Konzentrationen von

G327C/A601C\* ab. In diesem Versuch sollte daher funktionell aktives Toxin mit steigenden Konzentrationen des Doppelcystein-Derivates inkubiert und die porenbildende Aktivität dieser Hybridoligomere mittels Hämolyse untersucht werden.

Eine konstante Menge G325C\* wurde mit steigenden Konzentrationen G327C/A601C\* gemischt, mit Kaninchen Erythrozyten bei 37°C inkubiert und nach Zentrifugation die hämolytische Aktivität durch Messen der Überstände bei 414 nm bestimmt (Abbildung 12).



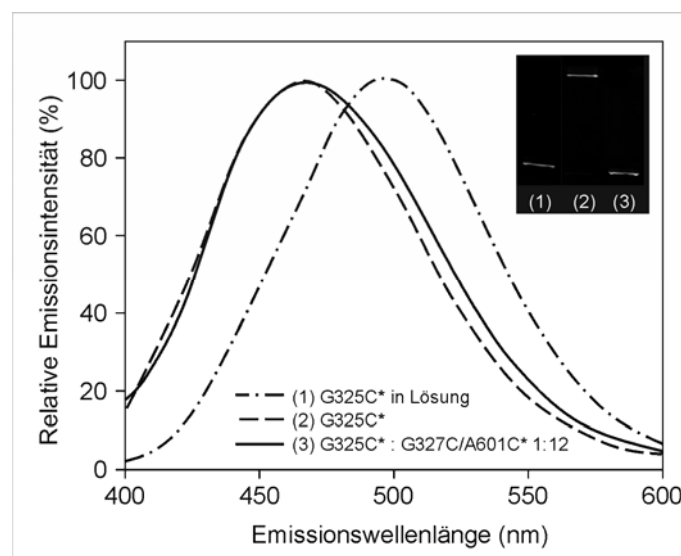
**Abbildung 12: Inhibierung von G325C\* durch Zugabe von G327C/A601C\*.**

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurde eine konstante Menge an G325C\* mit steigenden Konzentrationen des G327C/A601C\*-Toxins bei Raumtemperatur vorinkubiert, mit Kaninchen-Erythrozyten gemischt und bei 37°C 1h inkubiert. Die Hämolyse wurde durch Bestimmung der Absorption bei 414 nm quantifiziert. Angegeben sind die Durchschnittswerte und die Standardfehler drei unabhängiger Experimente.

Durch die Zugabe des unter oxidierenden Bedingungen inaktiven Doppelcystein-Derivates, wird die hämolytische Aktivität des aktiven G325C\*-Toxins schrittweise reduziert. Ein zweifacher Überschuss von G327C/A601C\* verringert die Hämolyse auf etwa 80 %, durch den fünffachen Überschuss werden lediglich etwa 25 % Hämolyse erreicht und nach der Zugabe eines 12fachen Überschusses ist kaum Hämolyse zu beobachten. Durch diese Ergebnisse wird die Annahme bestätigt, dass gemischte Oligomere aus aktiver und dem Doppelcystein-Derivat gebildet werden, wodurch nicht nur die SDS-Stabilität der Heterooligomere reduziert wird, sondern auch die Porenbildung inhibiert wird.

### 3.1.8. Einfluss von G327C/A601C\* auf die Insertionsfähigkeit von aktivem Toxin innerhalb gemischter Oligomere

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt, dass die Doppelcystein-Derivate mit aktivem Toxin assoziieren und gemischte Oligomere auf Membranen bilden. In den folgenden Experimenten wurde nun untersucht, ob die Fähigkeit des aktiven Toxins in die Membran zu inserieren, durch die Inkorporation von G327C/A601C\* beeinträchtigt wird. G325C\*-Toxin wurde an der freien Sulfhydryl-Gruppe mit dem umgebungssensitiven Fluorophor Acrylodan kovalent verknüpft, wodurch die Umgebung des Fluorophors am Aminosäure-Rest 325 analysiert werden kann. Eine konstante Menge Acrylodan-markiertes G325C\*-Toxin wurde allein oder mit einem 12fachen Überschuss des Doppelcystein-Derivats G327C/A601C\* inkubiert, an Membranen gebunden und mittels Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Zusätzlich wurde das Emissionsspektrum von G325C\* in Lösung aufgenommen (Abbildung 13) und die einzelnen Proben außerdem mittels SDS-PAGE bezüglich ihrer SDS-Stabilität analysiert.



**Abbildung 13: Emissionsspektrum des Acrylodan-markierten G325C\*-Toxins.**

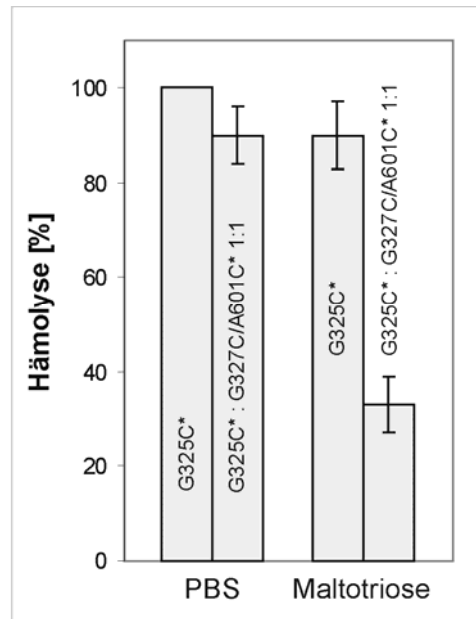
Dargestellt sind die Fluoreszenz-Emissionsspektren des aktivierten Acrylodan-markierten G325C\*-Toxins in Lösung (— - —), nach Inkubation mit Membranen (---) und mit dem 12fachen Überschuss des Doppelcystein-Derivates G327C/A601C\* (—) auf Membranen. Sowohl das Spektrum von G325C\* als auch der Mischung aus G325C\* und G327C/A601C\* zeigt nach der Inkubation mit Kaninchen-Ghosts eine Blauverschiebung. Im SDS-Gel sind G325C\* als Monomer (Spur 1), G325C\* nach der Inkubation mit Membranen (Spur 2) sowie die Mischung auf Membranen (Spur 3) aufgetragen.

Aminosäure 325 ist in der porenbildenden Sequenz von VCC lokalisiert und interagiert direkt mit der Membran. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums von Acrylodan ins Kurzwellige, der so genannte „Blue-Shift“, zeigt demnach den Transfer von Acrylodan in eine hydrophobe Umgebung und ist ein Zeichen für die partielle Insertion des Toxins in die

Membran. Das Spektrum des Acrylodan-markierten G325C\*-Toxins in Lösung besitzt ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 500 nm. Die Verschiebung des Emissionsmaximums nach der Inkubation von G325C\* mit Membranen (460 nm), zeigt eine Veränderung der Umgebungspolarität und die Insertion des Aminosäurerestes 325 in die Membran. Das Emissionsspektrum des Toxin-Gemisches nach der Inkubation mit Membranen ist auch bei einem 12fachen Überschuss des Doppelcystein-Derivates nicht von dem des G325C\*-Toxins zu unterscheiden (Abbildung 13), obwohl statistisch die meisten G325C\* Protomere mit sechs G327C/A601C\* Protomeren oligomerisieren und unter diesen Bedingungen keine SDS-stabile Oligomere gebildet werden (Abbildung 11, Spur 3). Diese Experimente bestätigen, dass gemischte Oligomere gebildet werden und die Fähigkeit von G325C\*, die porenbildende Sequenz partiell in die Membran zu inserieren, durch die Inkorporation in gemischte Oligomere nicht beeinträchtigt wird.

### **3.1.9. Gemischte Oligomere bilden Oligomere mit reduziertem funktionellen Durchmesser**

Es konnte gezeigt werden, dass die Doppelcystein-Derivate gemischte Oligomere mit funktionell aktivem Toxin bilden können, und die Interaktion mit der Membran des aktiven Toxins durch die Inkorporation von G327C/A601C\* nicht beeinträchtigt wird. Daher wurden osmotische Schutzversuche durchgeführt, um die effektive Porengröße der Hybridoligomere im Vergleich zu G325C\* zu bestimmen. Zur Analyse der effektiven Porengröße der gemischten Oligomere im Vergleich zu G325C\* wurden Kaninchen Erythrozyten in Puffer mit Dextran 4 aufgenommen und mit G325C\* und einer äquimolaren Mischung aus G325C\* und G327C/A601C\* bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird die Oligomerisierung und Porenbildung ermöglicht, die Lyse der Erythrozyten aber durch Dextran 4 verhindert. Die Zellen wurden zentrifugiert um ungebundenes Toxin mit dem Überstand zu entfernen, in Puffer mit und ohne Maltotriose aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Maltotriose besitzt eine Molekulargewicht von 504 Da und damit einen größeren effektiven Durchmesser als Natrium- bzw. Chlorid-Ionen. Maltotriose, die nicht durch die gebildete Pore in die Zelle aufgenommen werden kann, befindet sich bei der gewählten Konzentration im Gleichgewicht mit dem inneren osmotischen Druck der Zelle und verhindert so den Einstrom von Wassermolekülen und das damit verbundene Lysieren der Zelle (osmotischer Schutz).

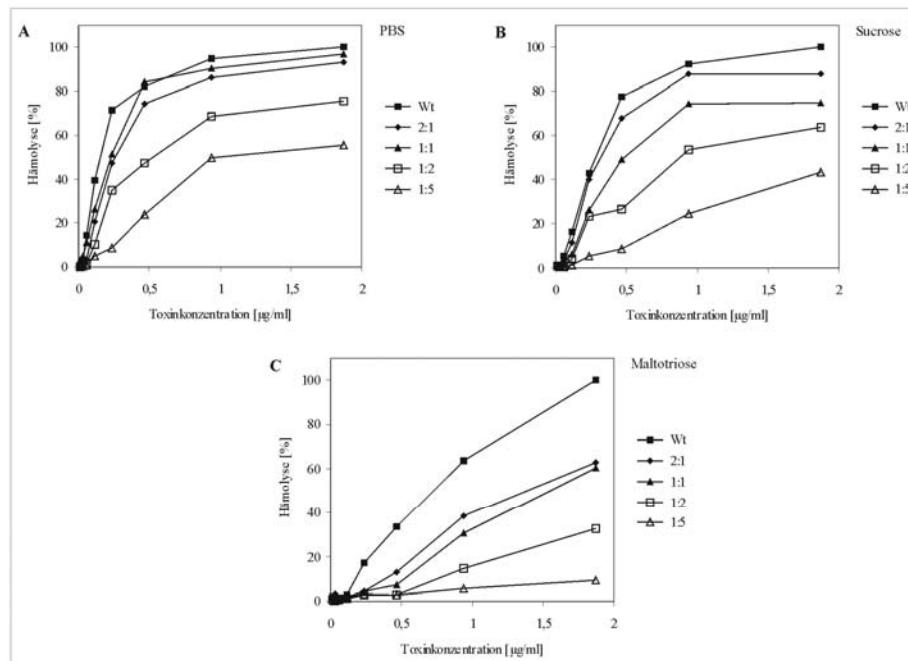


**Abbildung 14: Osmotischer Schutz von Kaninchen-Erythrozyten durch Maltotriose.**

Das Acrylodan-markierte G325C\*-Toxin sowie eine äquimolare Mischung aus G325C\* und G327C/A601C\* wurden in Anwesenheit von Dextran 4 bei 37°C an Kaninchen-Erythrozyten gebunden, zentrifugiert und in Puffer mit und ohne Maltotriose aufgenommen.

In Abbildung 14 ist die hämolytische Aktivität von G325C\* und der äquimolaren Mischung mit und ohne Maltotriose dargestellt. Die mit G325C\* inkubierten Erythrozyten lysieren sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Maltotriose. Im Gegensatz dazu werden die mit der Mischung inkubierten Zellen in der Gegenwart von Maltotriose teilweise geschützt.

Um den funktionellen Durchmesser gemischter Poren, bestehend aus aktivem Toxin und des insertionsdefizienten Toxins, weiter zu untersuchen, wurde die konzentrationsabhängige Lyse verschiedener Toxin-Mischungen in An- und Abwesenheit zwei unterschiedlicher osmotisch wirksamer Substanzen untersucht. Neben Maltotriose, mit einem molekularen Durchmesser von 1,2 nm, wurde zusätzlich Sucrose mit einem Durchmesser von 0,9 nm als Osmoprotektant verwendet (Schönherr et al., 1994). Aktiviertes Wt-Toxin und G327C/A601C\* wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, wobei die Gesamtoxinkonzentration konstant blieb, und im Anschluss eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt. Kaninchen-Erythrozyten wurden in PBS mit und ohne Sucrose oder Maltotriose aufgenommen und mit dem gleichen Volumen der Toxin-Mischungen bei 37°C inkubiert (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Inhibierung der VCC-induzierten Hämolyse durch osmotisch wirksamen Substanzen.**

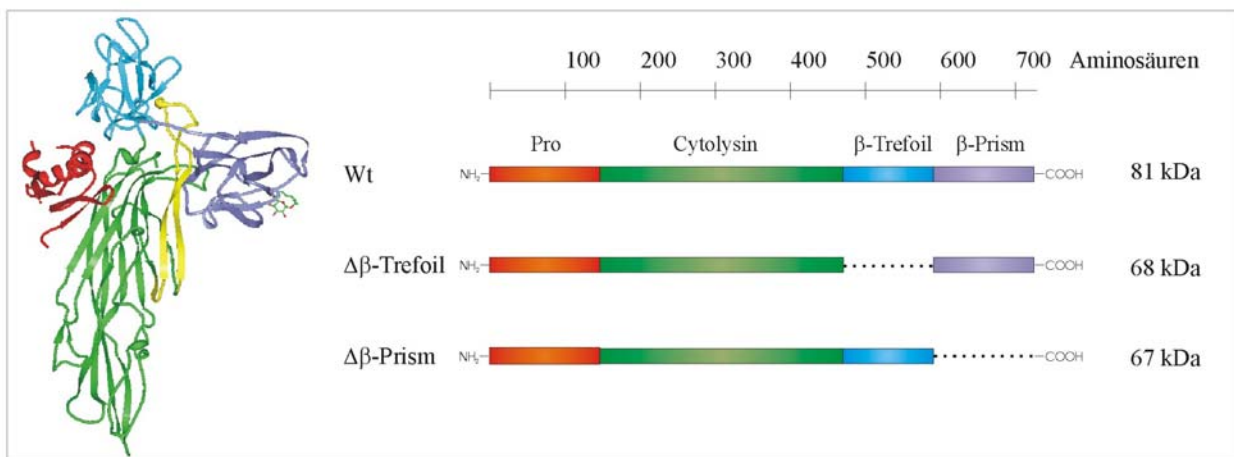
Wt-Toxin und G327C/A601C\* wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, eine Verdünnungsreihe erstellt und die Hämolyse in PBS (A) bzw. PBS ergänzt mit Sucrose (B) oder Maltotriose (C) bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis drei unabhängiger Experimente.

Der Verlauf der konzentrationsabhängigen Lyse des Wt-Toxins ohne osmotisch wirksamen Substanzen, stimmt mit dem der beiden Toxin-Mischungen 2:1 und 1:1 überein (Abbildung 15A). Erst ab einem Wt:G327C/A601C\*-Verhältnis von 1:2 wird die hämolytische Aktivität in PBS reduziert. Die Zugabe von Sucrose verringert die hämolytische Aktivität hingegen schon ab einem Wt:G327C/A601C\*-Verhältnis von 1:1 (Abbildung 15B). Maltotriose schützt die Zellen ab einem Verhältnis von 2:1 teilweise, und bei einem fünffachen Überschuss von G327C/A601C\* wird die Lyse der Zellen durch Maltotriose komplett verhindert (Abbildung 15C).

Dieser partielle Schutz durch Maltotriose und Sucrose bestätigt die Annahme, dass lediglich einige aktive Untereinheiten dieser gemischten Oligomere in die Membran inserieren, und so zu einer Reduktion des funktionellen Durchmessers der Pore führen.

### 3.2. Charakterisierung der beiden C-terminalen Domänen $\beta$ -Trefoil und $\beta$ -Prism

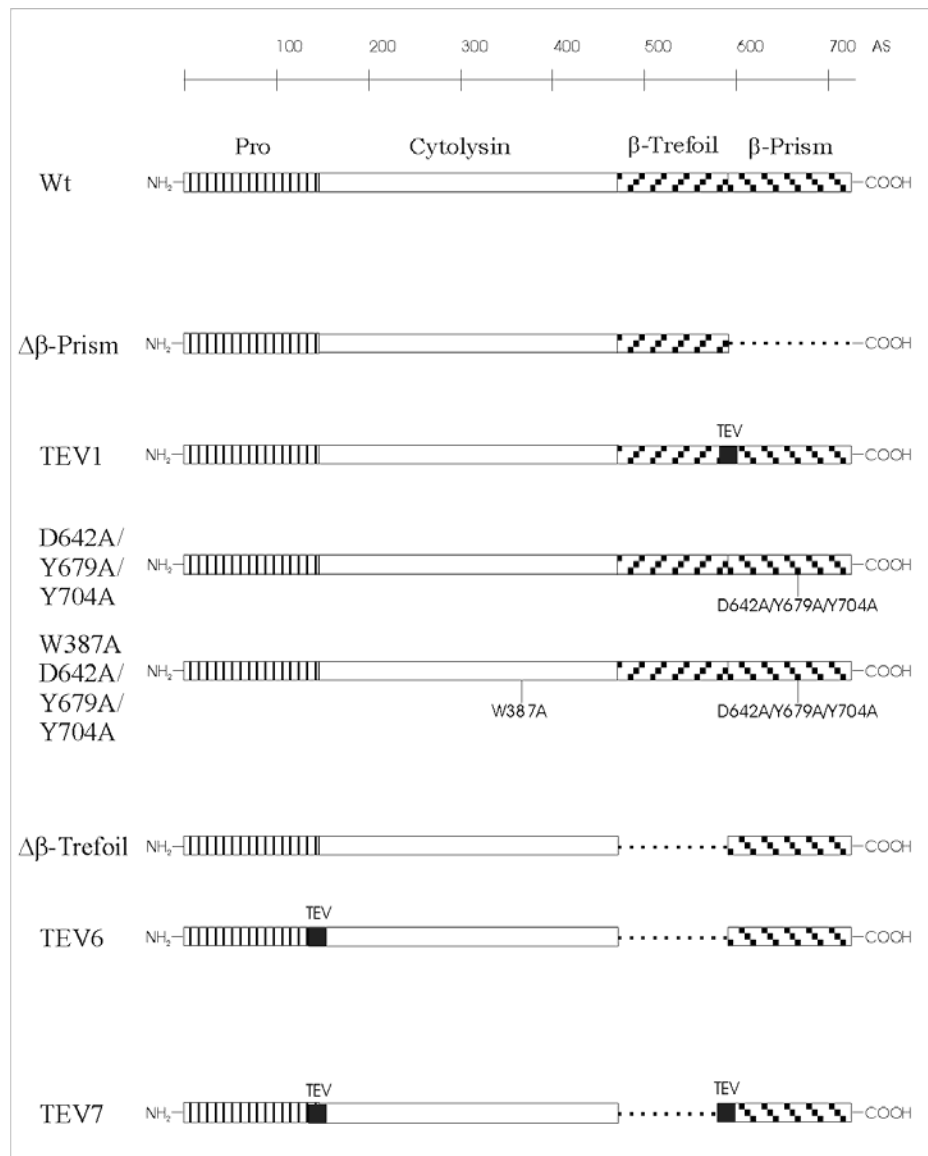
Zusätzlich zur cytolytischen Domäne, die den strukturellen Kern des VCC-Monomers darstellt, besitzt VCC im Vergleich zu den ähnlichen  $\beta$ -PTFs  $\alpha$ -Toxin und LukF aus *Staphylococcus aureus*, drei einzigartige Domänen: die N-terminale Pro-Domäne, sowie die beiden C-terminalen Lektin-ähnlichen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism (Abbildung 16). Im Gegensatz zur Pro-Domäne, die als intramolekulares Chaperon fungiert und deren Spaltung erst die Aktivität des Toxins ermöglicht, ist die Funktion der beiden C-terminalen Domänen wenig untersucht und verstanden.



**Abbildung 16: Übersicht der einzelnen Domänen des VCC-Monomers.**

Darstellung des VCC-Moleküls und der einzelnen Domänen. Die Pro-Domäne ist in rot gezeigt, der cytolytische Kern mit der porenbildenden Sequenz in grün bzw. gelb, und die beiden C-terminalen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism in blau und violett. Die Übersicht zeigt drei Deletions-Konstrukte und den Wild-Typ, sowie schematisch die Zahl der Aminosäuren und das errechnete Molekulargewicht.

Da  $\beta$ -Trefoil strukturelle Ähnlichkeiten zu Ricin aufweist, einem Pflanzentoxin, das zwei solcher  $\beta$ -Trefoil Domänen besitzt, die an der Bindung von Zuckern beteiligt sind, und  $\beta$ -Prism strukturhomolog zu anderen zuckerbindenden Proteinen ist, wurden verschiedenen VCC-Derivate konstruiert, um die Rolle der beiden Domänen bei der Bindung an Membranen zu untersuchen (Abbildung 17). Zunächst wurden die beiden Domänen einzeln deletiert, die VCC-Derivate charakterisiert und der Einfluss der Domänen auf die hämolytische Aktivität sowie die Bindung analysiert. Darüber hinaus wurden durch *in-vitro* Mutagenese Punktmutationen in der  $\beta$ -Prism Domäne erzeugt, um die Rolle einzelner Aminosäuren bei der Bindung an Membranen untersuchen.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der konstruierten VCC-Derivate.**

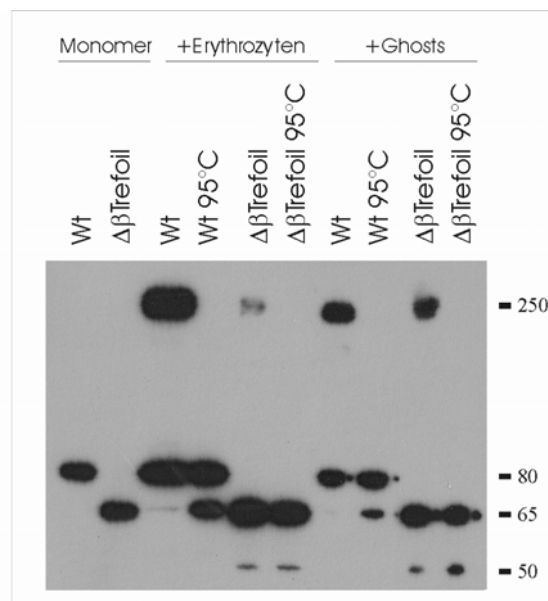
Diese Abbildung zeigt schematisch einen Teil der konstruierten *Vibrio cholerae* Cytolysin-Derivate mit der Pro-, Cytolysin-,  $\beta$ -Prism- und  $\beta$ -Trefoil-Domänen. Die deletierten Bereiche sind durch gestrichelte Linien (---) dargestellt, die eingeführte TEV-Schnittstelle schematisch durch ein schwarzes Quadrat (■). AS entspricht der Anzahl der Aminosäuren.

### 3.2.1. Reinigung und Charakterisierung des $\Delta\beta$ -Trefoil-Derivates

Um die Funktion der C-terminalen  $\beta$ -Trefoil Domäne zu charakterisieren, wurde mittels *in vitro* Mutagenese die gesamte Domäne, das entspricht der Sequenz von Aminosäure 485 bis 606, deletiert, und ein weiteres VCC-Derivat konstruiert, bei der lediglich die Aminosäuresequenz von 513 bis 606 entfernt wurde. Die beiden VCC-Konstrukte,  $\Delta\beta$ -Trefoil bzw.  $\Delta\beta$ -Trefoil2, sowie das Wt-Toxin wurden heterolog in *E. coli* M15 exprimiert, und die Proteine zur Charakterisierung affinitätschromatografisch gereinigt. Die Analyse von  $\Delta\beta$ -Trefoil durch SDS-PAGE zeigt eine einzelne Bande auf Höhe des errechneten



Molekulargewichts von etwa 68 kDa im Vergleich zum Wild-Typ mit 81 kDa (Abbildung 18). Um die hämolytische Wirkung des VCC-Derivates mit dem Wild-Typ zu vergleichen, wurden die eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt und die Aktivität der Pro-Toxine analysiert. Nach der Inkubation des  $\Delta\beta$ -Trefoil-Toxins mit Kaninchen Erythrozyten aggregierten die Zellen im Gegensatz zum Wild-Typ Toxin stark und es wurde keine Lyse der Zellen beobachtet. Um die Ursache der fehlenden hämolytischen Aktivität des VCC-Derivates im Vergleich zum Wild-Typ näher zu untersuchen, wurde das Pro-Toxin an Kaninchen-Erythrozyten und Ghosts gebunden und die spontane Spaltung durch membrangebundene zelluläre Proteasen mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 18).

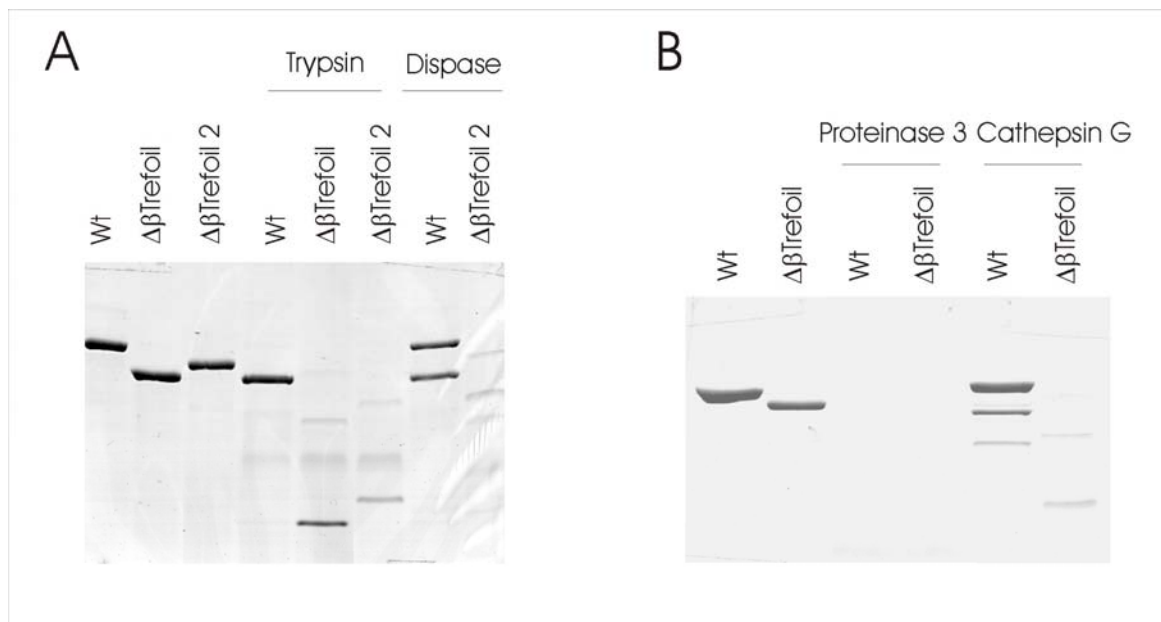


**Abbildung 18: Spontane Spaltung von  $\Delta\beta$ -Trefoil durch Erythrozyten- und Ghost-Proteasen.**

Die spontane Spaltung von  $\Delta\beta$ -Trefoil durch Erythrozyten und Ghosts Proteasen wurde vergleichend mit dem Wild-Typ mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Aufgetragen wurde das Monomer in Lösung und die Toxine nach Inkubation mit Erythrozyten und Ghosts bei 37°C.

Im Fall des Wild-Typs wird das membrangebundene Pro-Toxin (81 kDa) sowohl nach der Inkubation mit Kaninchen Erythrozyten als auch Erythrozyten Ghosts proteolytisch aktiviert (66 kDa) und oligomerisiert auf der Membran zu SDS-stabilen Oligomeren (250 kDa). Im Vergleich zum Wild-Typ ist die spontane Spaltung des membrangebundenen Pro-Toxins (68 kDa) durch Erythrozyten-Proteasen bei  $\Delta\beta$ -Trefoil auffallend stark reduziert, wodurch die Oligomerisierung des Toxins fast vollkommen verhindert wird. Im Vergleich zu Kaninchen Erythrozyten wird das  $\Delta\beta$ -Trefoil Pro-Toxin hingegen durch die Inkubation mit Erythrozyten-Ghosts stärker aktiviert (53 kDa), und assembliert zu SDS-stabilen Oligomeren.

Da die proteolytische Spaltung für die Aktivität des Toxins notwendig ist, wurden die Toxine zunächst in Lösung durch Trypsin aktiviert und die hämolytische Aktivität bestimmt. Weder  $\Delta\beta$ -Trefoil noch  $\Delta\beta$ -Trefoil2 verursachen als aktives VCC die Aggregation der Erythrozyten, führen aber auch nicht zur Lyse. Daher wurde die Spaltung des Pro-Toxins in Lösung mit verschiedenen Proteasen mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 19). Im Fall des Wild-Typs wird Pro-VCC sowohl durch Trypsin, Dispase und Cathepsin G proteolytisch zu aktivem VCC gespalten und lediglich durch Proteinase 3 ist die Degradation des Toxins zu beobachten. Im Gegensatz dazu verursachen alle getesteten Proteasen eine starke Degradation der beiden VCC-Derivate ohne die  $\beta$ -Trefoil-Domäne.



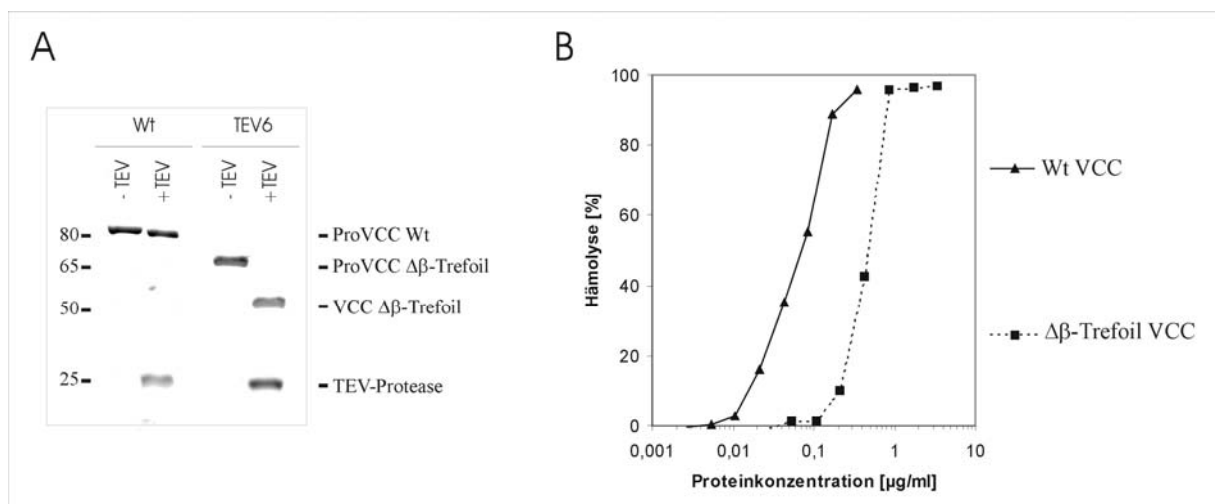
**Abbildung 19: Proteasestabilität der verkürzten VCC-Derivate im Vergleich zum Wild-Typ.**

Die VCC-Derivate und der Wild-Typ wurden ohne Protease oder nach Inkubation mit verschiedenen Proteasen mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie). Jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  Toxin wurde mit (A) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsin (auf Eis 15 Minuten), mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Dispase (30 Minuten bei 37°C), (B) mit 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Proteinase 3 (5 Minuten bei 37°C) und mit 0,04 U/ml Cathepsin G (30 Minuten bei 37°C) inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin abgestoppt.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne einerseits zu einer stark reduzierten Spaltung des Pro-Toxins nach der Bindung an Erythrozyten führt, andererseits nimmt die Proteasestabilität des Pro-Toxins in Lösung durch das Entfernen dieser Region stark zu.

### 3.2.2. Spaltung und Aktivierung von $\Delta\beta$ -Trefoil-ProVCC zu $\Delta\beta$ -Trefoil-VCC durch die TEV-Protease

Wegen der erhöhten Anfälligkeit des Pro-Toxins gegen verschiedene Proteasen nach der Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne in Lösung, wurde zusätzlich eine TEV-Schnittstelle zwischen der Pro-Region und der cytolytischen Domäne eingeführt (Abbildung 17, TEV6), wodurch die Spaltung des Pro-Stücks hochspezifisch an dieser Stelle erfolgt und die Aktivierung des Toxins in Lösung ermöglicht wird. Auf diese Weise kann der Einfluss der  $\beta$ -Trefoil Domäne auf die Oligomerisierung des Toxins auf Membranen untersucht werden. Bei der TEV-Protease handelt es sich um die aus dem Tabacco Etch Virus (TEV) stammende 27 kDa große cytolytische Domäne des Nuclear Inclusion a (NIa) Proteins. Im Vergleich zu Thrombin oder der Enterokinase, ist die Sequenzspezifität dieser Protease höher und daher unter anderem ideal für die Spaltung von Fusionsproteinen geeignet. Die TEV-Protease erkennt ein lineares Epitop E-X<sub>aa</sub>-X<sub>aa</sub>-Y-X<sub>aa</sub>-Q-(G/S), wobei die Spaltung zwischen Q und G erfolgt. TEV6 wurde heterolog in *E. coli* M15 exprimiert und affinitätschromatografisch gereinigt. Das renaturierte Pro-Toxin wurde in Lösung mit der TEV-Protease inkubiert, und die Effizienz der Spaltung mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Kontrolle der Proteasespezifität wurde Wt-Toxin ebenfalls mit und ohne TEV-Protease inkubiert.

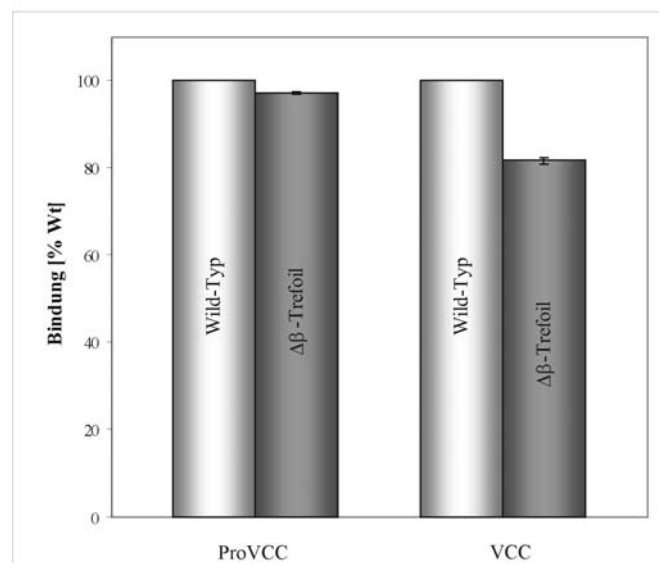


**Abbildung 20: Spaltung von TEV6 durch die TEV-Protease und konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität des Wild-Typs und TEV6 nach der Spaltung.**

(A) Spaltung der N-terminalen Pro-Region zur Aktivierung der Toxine durch Zugabe der TEV-Protease. Wt und TEV6 wurden 4 Stunden mit und ohne TEV-Protease bei 30°C inkubiert und jeweils 2,5  $\mu\text{g}$  der Ansätze mittels SDS-PAGE bezüglich der Effizienz der Spaltung und Sequenzspezifität der Protease analysiert. (B) Konzentrationsabhängige Lyse des Wild-Typs und TEV6 nach Aktivierung durch Trypsin bzw. TEV-Protease. Die hämolytische Aktivität der Toxine wurde nach der Zugabe von Kaninchen Erythrozyten durch Messen des Überstandes bei 414 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Abbildung 20A zeigt die Aktivierung des 65 kDa großen TEV6-Toxins durch die Zugabe der TEV-Protease zu aktivem Toxin mit einem Molekulargewicht von 52 kDa, Wt-Toxin hingegen wurde nicht modifiziert. Auch die vorherige Zugabe des TEV6-Derivates als Pro-Toxin zu Kaninchen Erythrozyten führt zu einer starken Aggregation, die aber nach der Spaltung der Pro-Region mittels TEV-Protease nicht beobachtet wird. Verglichen mit dem Wild-Typ Toxin wird eine siebenfach höhere Konzentration des VCC-Derivats ohne  $\beta$ -Trefoil zur 50 %igen Lyse der Erythrozyten benötigt (Abbildung 20B). Die Deletion der  $\beta$ -Trefoil-Domäne per se führt demnach nach der Aktivierung des Toxins lediglich zu einer reduzierten hämolytischen Aktivität im Vergleich zum Wild-Typ.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte hämolytische Aktivität des Derivates ist die verminderte Bindung des Toxins an Membranen. Um den Einfluss der  $\beta$ -Trefoil Domäne auf die Bindung an Membranen untersuchen zu können, wurden die Toxine mit Fluoreszeinmaleimid an den freien Sulfhydryl-Gruppen markiert und fluoreszenzspektrometrisch analysiert. Die markierten Toxine wurden renaturiert, sowohl als ProVCC und VCC bei 4°C an Membranen gebunden und ungebundenes Toxin durch Zentrifugation entfernt. Die Emissionsspektren der Toxine in Lösung, sowie nach der Bindung an Erythrozyten Ghosts wurden aufgenommen, und die Menge an membrangebundenem Toxin anhand der relativen Emissionsintensität im Vergleich zur zugegebenen Toxinmenge abgeschätzt (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Bindung von fluoreszenzmarkiertem Pro-VCC und VCC an Erythrozyten Ghosts.**

Je 25  $\mu\text{g}$  Toxin wurden 1 Stunde bei 4°C mit 100  $\mu\text{l}$  konz. Ghosts ( $10^9$  Zellen/ml) in 700  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen inkubiert. Ungebundenes Toxin wurde durch Zentrifugation mit dem Überstand entfernt und Emissionsspektren des Toxins in Lösung, des Überstandes sowie nach der Bindung aufgenommen. Dargestellt ist der Prozentsatz an gebundenem Toxin in Bezug auf Wild-Typ Toxin. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte und Standardfehler drei unabhängiger Versuche.

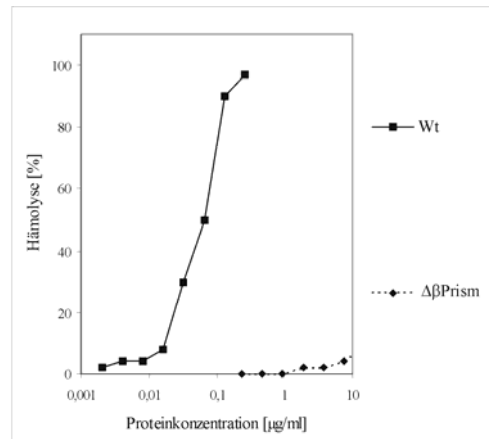
Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, ist die Fähigkeit des Toxins als ProVCC an Membranen zu binden vergleichbar mit dem Wild-Typ, obwohl die Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne einen Verlust der hämolytischen Aktivität zur Folge hat. Nach der Aktivierung des Toxins wurde die Bindung von  $\Delta\beta$ -Trefoil im Vergleich zum Wild-Typ auf etwa 80 % reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion der gesamten  $\beta$ -Trefoil Domäne die Aggregation von Erythrozyten fördert, sofern das Toxin nicht durch Entfernen der N-terminalen Pro-Region aktiviert wurde. Das Ausmaß der Bindung von ProVCC an Membranen bleibt aber vergleichbar zum Wild-Typ. Obwohl insgesamt 122 Aminosäuren, das entspricht etwa 1/6 des Toxins deletiert wurden, reduzierte sich die hämolytische Aktivität des aktivierten Toxins um etwa Faktor sieben und die Bindung um etwa 20 %.

### **3.2.3. Charakterisierung der C-terminalen $\beta$ -Prism Domäne**

#### **3.2.3.1. Reinigung und Charakterisierung des $\Delta\beta$ -Prism- und des TEV1-Derivates**

Die Bindung von *Vibrio cholerae* Cytolysin an Membranen erfolgt unter anderem über  $\beta$ 1-Galaktosyl-Reste von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche. Dabei ist vermutlich die  $\beta$ -Prism Domäne, die bei der Kristallisation des Toxins die Kopfgruppe von  $\beta$ -Octylglucosid ( $\beta$ OG) bindet, beteiligt (Olson & Gouaux, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die gesamte  $\beta$ -Prism Domäne, Sequenz von Aminosäure 607 bis Aminosäure 741, mittels *in vitro* Mutagenese deletiert und  $\Delta\beta$ -Prism heterolog in *E. coli* exprimiert. Das VCC-Derivat wurde zunächst gereinigt und charakterisiert. Das errechnete Molekulargewicht von  $\Delta\beta$ -Prism beträgt als ProVCC 66,5 kDa, nach der proteolytischen Spaltung der N-terminalen Pro-Region zur Aktivierung des Toxins 50 kDa und wurde mittels SDS-PAGE bestätigt (nicht dargestellt). Um den Einfluss der Deletion auf die hämolytische Aktivität zu untersuchen, wurde das Toxin renaturiert, durch Zugabe von Trypsin aktiviert, mit Kaninchen Erythrozyten gemischt und die Aktivität im Vergleich zum Wild-Typ bestimmt. Im Gegensatz zu Wild-Typ-Toxin bleibt  $\Delta\beta$ -Prism auch bei einer Proteinkonzentration von etwa 10  $\mu$ g/ml hämolytisch inaktiv. Diese Ergebnisse zeigen, dass die deletierten 135 C-terminalen Aminosäuren entscheidenden Einfluss auf die biologische Funktion des Toxins besitzen.



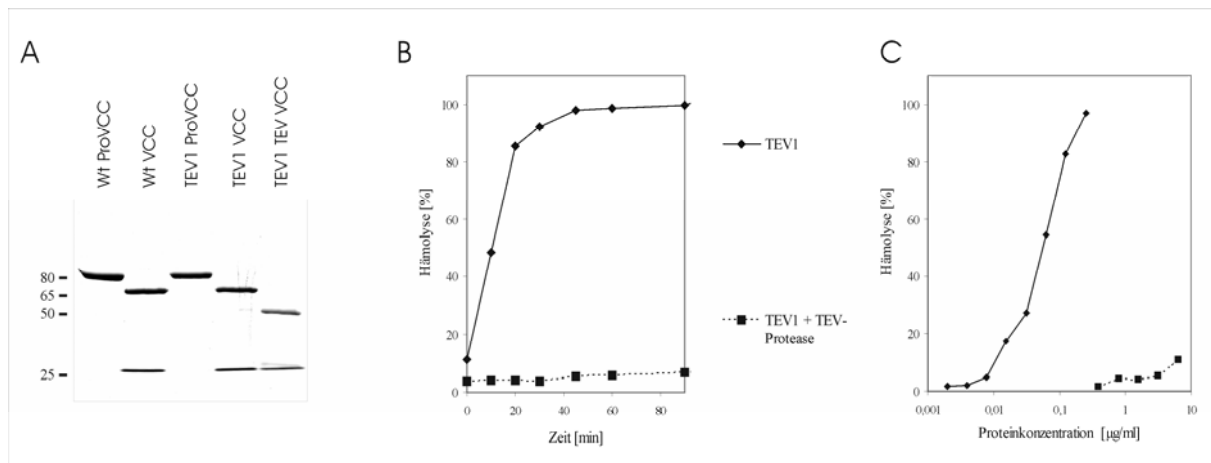
**Abbildung 22: Konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität von  $\Delta\beta$ -Prism im Vergleich zum Wild-Typ.**

Wild-Typ- und  $\Delta\beta$ -Prism-Toxin wurden durch Trypsin aktiviert, mit Kaninchen Erythrozyten gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die hämolytische Aktivität wurde durch Messen der Überstände bei 414 nm bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis drei unabhängiger Versuche.

Durch frühere Experimente von Olson und Gouaux (Olson & Gouaux, 2005), wurde gezeigt, dass die Deletion der C-terminalen Region (Aminosäure 608 bis 741) lediglich eine Reduktion der hämolytischen Aktivität um etwa Faktor zehn zur Folge hat. Diese Ergebnisse konnten jedoch zunächst nicht mit  $\Delta\beta$ -Prism bestätigt werden (Abbildung 22). Die Expression dieses verkürzten Konstruktes (Olson & Gouaux, 2005) erfolgte im Gegensatz zu  $\Delta\beta$ -Prism in *E. coli* Origami B Zellen, die durch ein oxidierendes Cytoplasma die Disulfidbrückenbildung von Proteinen unterstützen und damit die Produktion löslichen Toxins ermöglichen. Da die Expression von VCC in *E. coli* M15 zur Bildung von Einschlusskörperchen führt, erfolgte die Reinigung von  $\Delta\beta$ -Prism unter denaturierenden Bedingungen (siehe auch Material und Methoden). Demnach könnte die Renaturierung von  $\Delta\beta$ -Prism durch die Deletion der C-terminalen Domäne beeinträchtigt werden und die Inaktivität des Toxins erklären. Um den C-Terminus erst nach der Renaturierung des Toxins zu entfernen, wurde eine zusätzliche TEV-Schnittstelle zwischen der cytolytischen Region und der  $\beta$ -Prism Domäne eingefügt (Abbildung 17, TEV1). Das errechnete Molekulargewicht von TEV1 beträgt als ProVCC etwa 82 kDa, nach der Aktivierung durch Trypsin 66 kDa, nach der Spaltung durch die TEV-Protease zum Entfernen der C-terminalen 135 Aminosäuren 50 kDa und wurde durch SDS-PAGE bestätigt (Abbildung 23A).

Um den Einfluss der  $\beta$ -Prism-Domäne auf die hämolytische Aktivität zu untersuchen, wurde TEV1 mit und ohne TEV-Protease inkubiert, durch Trypsin aktiviert und mit Kaninchen Erythrozyten 1,5 Stunde bei 37°C inkubiert. Abbildung 23B zeigt den zeitlichen Verlauf der

Hämolyse von TEV1 vor und nach der Inkubation mit der TEV-Protease innerhalb der ersten 90 Minuten. Obwohl TEV1 zur Lyse der Erythrozyten führte, war nach der Spaltung der C-terminalen Domäne, wie schon bei  $\Delta\beta$ -Prism, keine Hämolyse zu beobachten.



**Abbildung 23: Spaltung des TEV1-Derivates durch die TEV-Protease und Bestimmung der hämolytischen Aktivität vor und nach der Spaltung.**

(A) SDS-PAGE von TEV1 und dem Wild-Typ. Aufgetragen ist der Wild-Typ als Pro-Toxin (Wt ProVCC), sowie nach der Aktivierung durch Trypsin (Wt VCC). TEV1 als ProVCC (TEV1 ProVCC), nach der Aktivierung durch Trypsin (TEV1 VCC), und nach Entfernen des C-Terminus durch die TEV-Protease und Aktivierung durch Trypsin (TEV1 TEV VCC). (B) Kinetik der hämolytischen Aktivität von TEV1 mit und ohne TEV-Protease. Jeweils 10  $\mu\text{g}$  Toxin wurden mit und ohne TEV-Protease über Nacht inkubiert, durch Spaltung mit Trypsin aktiviert, mit Kaninchen Erythrozyten gemischt und die hämolytische Aktivität durch Messen der Überstände bei 414 nm bestimmt. (C) Konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität von TEV1 mit und ohne TEV-Protease. Die Toxine wurden durch Trypsin aktiviert und mit Kaninchen Erythrozyten 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Versuche.

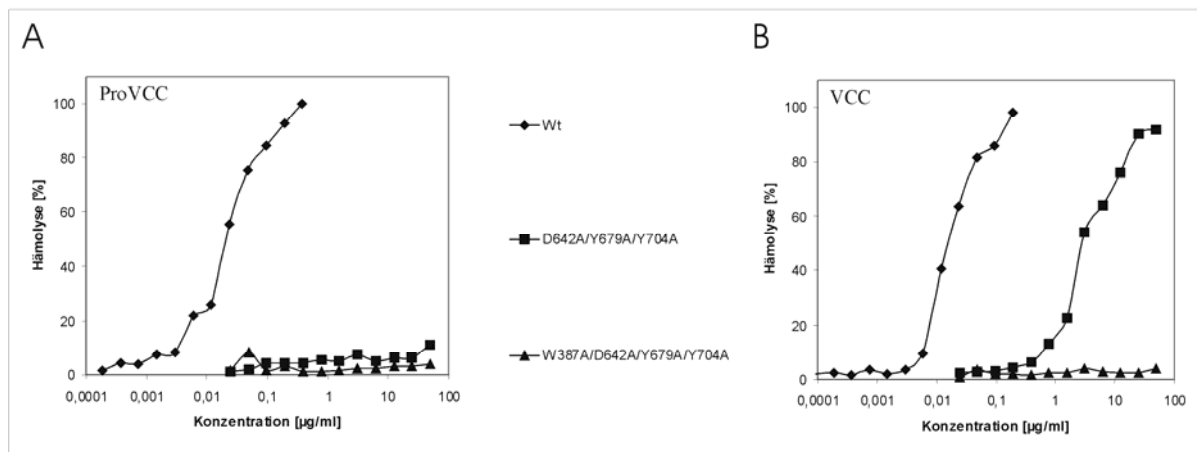
Weiterhin wurde die hämolytische Aktivität nach der Aktivierung der Toxine durch die Zugabe von Trypsin untersucht, allerdings wurde auch bei einer Konzentration von etwa 5  $\mu\text{g/ml}$  keine Lyse nach der Spaltung der C-terminalen Region beobachtet (Abbildung 23C).

### 3.2.3.2. Einfluss einzelner Aminosäurereste auf die hämolytische Aktivität von *Vibrio cholerae* Cytolysin

Die  $\beta$ -Prism-Domäne besitzt eine dreifach Symmetrie sowie strukturelle Ähnlichkeiten zu zuckerbindenden Proteinen wie *Maclura pomifera* Agglutinin (MPA) (Lee et al., 1998) oder Jacalin (Sankaranarayanan, R, Sekar, k, 1996). Alle drei Proteine enthalten einen Aspartat-Rest (bei VCC Asp642), der möglicherweise über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe des Zuckers interagiert und zwei Tyrosin-Reste (bei VCC Tyr679 und Tyr704), die mit dem Zuckerring wechselwirken. Bei der Kristallisation von VCC wurde

gezeigt, dass  $\beta$ -Octylglykosid in einer flachen Tasche der  $\beta$ -Prism-Domäne gebunden wird, und mit benachbarten VCC-Molekülen durch Aminosäurerest Tryptophan 387, der in der cytolytischen Region lokalisiert ist, interagiert. Obwohl  $\beta$ -Octylglykosid kein physiologisch relevantes Ziel für VCC darstellt, ist es dennoch möglich, dass die  $\beta$ -Prism-Domäne an der Bindung einer zuckerhaltigen Struktur beteiligt ist. Um die Rolle dieser vier Aminosäuren bei der Bindung von *Vibrio cholerae* Cytolysin an Membranen zu analysieren, wurden mittels *in vitro* Mutagenese zwei VCC-Derivate konstruiert. Zunächst wurden Aminosäurereste Aspartat 642, Tyrosin 679 und Tyrosin 704 durch Alanine ersetzt (D642A/Y679A/Y704A). Zusätzlich zu diesen drei Aminosäuren wurde bei dem zweiten Konstrukt Tryptophan 387 durch Alanin ausgetauscht (W387A/D642A/Y679A/Y704A).

Die Konstrukte und der Wild-Typ wurden in *E. coli* exprimiert und zur weiteren Charakterisierung gereinigt. Im SDS-Gel zeigen beide Toxin-Derivate eine einzelne Bande, die sich erwartungsgemäß nicht von der des Wild-Typ Toxins unterscheidet (nicht dargestellt). Um die biologische Aktivität der Derivate im Vergleich zum Wild-Typ zu untersuchen, wurde die Hämolyse der Toxine als Pro-VCC und VCC an Kaninchen Erythrozyten bei 37°C bestimmt (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Hämolytische Aktivität von D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A.**

(A) Konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität der Toxine als ProVCC. Die Toxine wurden mit Kaninchen Erythrozyten gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. (B) Die Toxine wurden durch Zugabe von Trypsin aktiviert, mit Kaninchen Erythrozyten gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Absorption der Überstände wurde bei 414 nm gemessen und die hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

Eine 50%ige Lyse von Kaninchen Erythrozyten wird bei einer Wild-Typ Konzentration von etwa 60 ng/ml erreicht. Die VCC-Derivate D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A hingegen verursachen als Pro-VCC auch bei einer

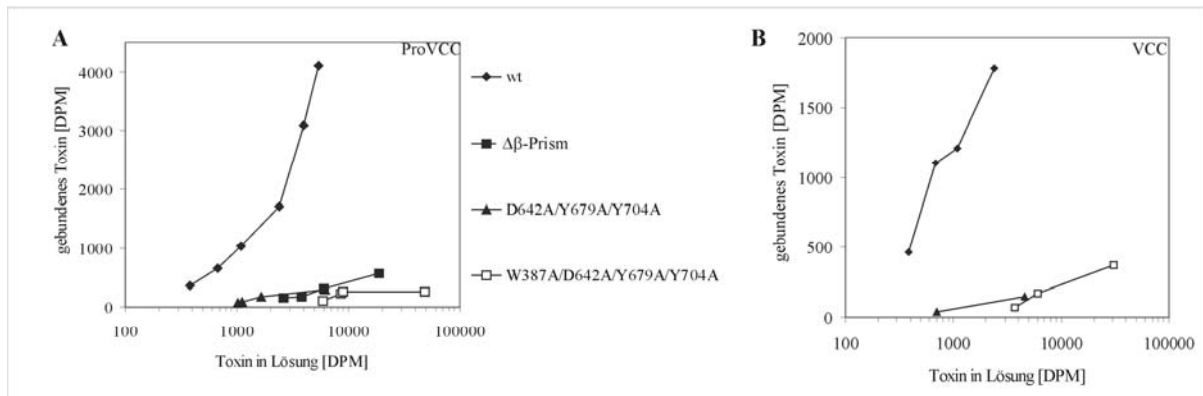


Konzentration von über 25 µg/ml keine Lyse der Erythrozyten. Nach der Aktivierung des VCC-Derivats D642A/Y679A/Y704A durch Trypsin ist allerdings eine hämolytische Aktivität zu beobachten. Die Konzentration, die zur 50%igen Lyse der Erythrozyten führt, ist im Vergleich zum Wt-Toxin aber etwa um Faktor 50 höher. Auch nach der Aktivierung von W387A/D642A/Y679A/Y704A verursacht das Toxin bis zu einer Konzentration von über 25 µg/ml keine Lyse.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hämolytische Aktivität beider Toxine schon durch den Austausch von drei bzw. vier Aminosäuren stark beeinträchtigt wird. Die Aminosäurereste W387, D642, Y679 und Y704 haben demnach eine entscheidende Funktion in Bezug auf die biologische Aktivität.

#### **3.2.4. Rolle der $\beta$ -Prism-Domäne bei der Bindung an Membranen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bislang die Rolle der C-terminalen  $\beta$ -Prism-Domäne, sowie einzelner Aminosäurereste auf die hämolytische Aktivität von *Vibrio cholerae* Cytolysin untersucht. Zusätzlich wurden der Wild-Typ,  $\Delta\beta$ -Prism sowie die beiden Substitutionsmutanten W387A/D642A/Y679A/Y704A und D642A/Y679A/Y704A mit [<sup>3</sup>H]-NEM radioaktiv an den beiden freien Sulfhydrylgruppen markiert, um die Bindung an Membranen zu untersuchen. Sowohl Pro-VCC als auch VCC wurden in verschiedenen Konzentrationen (100 ng/ml bis 2,5 µg/ml) bei 4°C an Kaninchen-Erythrozyten gebunden, durch Zentrifugation ungebundenes Toxin entfernt und die Zellen dreimal mit Phosphatpuffer zur Entfernung des Hämoglobins gewaschen. Die Bindung der Toxine ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass im Gegensatz zu Wt-Toxin weder  $\Delta\beta$ -Prism noch die Toxin-Derivate D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A als ProVCC (Abbildung 25A) an Membranen binden. Auch nach der proteolytischen Aktivierung der Toxin-Derivate D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A ist die Bindung dieser Toxine im Vergleich zum Wild-Typ stark reduziert.



**Abbildung 25: Bindung von  $^3\text{H}$ -NEM-derivatisiertem ProVCC und VCC an Erythrozyten.**

Wt-Toxin und die VCC-Derivate  $\Delta\beta$ -Prism, D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A wurden als ProVCC (A) und VCC (B) 1 Stunde auf Eis an Kaninchen Erythrozyten gebunden, ungebundenes Toxin durch Zentrifugation entfernt und das Pellet dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Zell-gebundenes Toxin wurde wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Aufgetragen ist die Radioaktivität der Toxine in Lösung in DPM (Zerfall pro Minute) und die gebundene Radioaktivität.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die C-terminale  $\beta$ -Prism Domäne die Bindung an Membranen vermittelt und besonders drei Aminosäuren, Aspartat-Rest 642, und die beiden Tyrosin-Reste 679 und 704, essentielle Reste für die Membranbindung des Toxins darstellen.

## 4. Diskussion

VCC gehört zur Gruppe der oligomerisierenden porenbildenden Toxine, die von einer Vielzahl verschiedener pathogener Bakterien produziert werden.  $\beta$ -PFTs werden als wasserlösliche Monomere sezerniert, binden über Rezeptoren an Membranen und oligomerisieren in einen porenbildenden Komplex. Die Prä-Pore als Zwischenstufe der Porenbildung wurde als erstes von Walker et al. (1995) für  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* postuliert und bereits für viele  $\beta$ -PFTs aus Gram-positiven Bakterien nachgewiesen. Durch die Oligomerisierung in einen insertionsfähigen Komplex (Prä-Pore) wird die Insertion der membrandurchspannenden  $\beta$ -Barrel erleichtert.

Obwohl VCC strukturelle Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* aufweist, besitzt es drei einzigartige Domänen: die N-terminale Pro-Region und die beiden C-terminalen Domänen  $\beta$ -Trefoil und  $\beta$ -Prism. Wie andere  $\beta$ -PFTs, die von Gram-negativen Bakterien sezerniert werden, benötigt auch *Vibrio cholerae* Cytolysin post-translationale Modifikationen zur Aktivierung des Toxins. Durch die proteolytische Spaltung der N-terminalen Pro-Region wird Pro-VCC zu reifem VCC aktiviert. Die Funktion der beiden C-terminalen Domänen ist bislang wenig untersucht, allerdings wird eine Funktion dieser beiden Domänen bei der Bindung an Membranen postuliert.

### 4.1. Nachweis der Prä-Pore als Zwischenstufe der Porenbildung von *Vibrio cholerae* Cytolysin

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Cystein-Substitutionmutanten (Valeva et al., 2005) innerhalb der porenbildenden Sequenz deuteten darauf hin, dass VCC als amphipatisches  $\beta$ -Faltblatt in die Membran inseriert. Aminosäurereste 311 bis 343 durchqueren zweimal die Membran, wobei die hydrophoben Reste zur Lipidschicht zeigen und die hydrophilen Richtung Porenlumen. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von Pro-VCC (Olson et al., 2005) wurden diese Ergebnisse bestätigt. Damit gehört VCC, ebenso wie  $\alpha$ -Toxin (Montoya & Gouaux, 2003), LukF (Gouaux et al., 1997) beide aus *Staphylococcus aureus*, Anthrax-Toxin (Benson et al., 1998) und Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* (Iacovache et al., 2006) zur Gruppe der Toxine, deren porenbildende Sequenzen als  $\beta$ -Faltblätter in Membranen inserieren und eine so genannte  $\beta$ -Barrel bilden ( $\beta$ -PFTs). Im Gegensatz zu den  $\beta$ -PFTs aus *Staphylococcus aureus* besitzen VCC und Aerolysin eine

zusätzliche N-terminale Pro-Region, deren posttranslationale proteolytische Spaltung zur Aktivierung der Toxine notwendig ist (Nagamune et al., 1996; Van der Goot et al., 1992). Trotz struktureller Unterschiede und der Notwendigkeit posttranslationaler Modifikationen bei VCC und Aerolysin, bilden diese beiden Toxine, ebenso wie  $\alpha$ -Toxin, Poren mit jeweils sieben Protomeren. Zusätzlich zeigt die cytolytische Region von VCC, und insbesondere die porenbildende Sequenz, große strukturelle Ähnlichkeit zu  $\alpha$ -Toxin und den Leukocidinen aus *Staphylococcus aureus*.

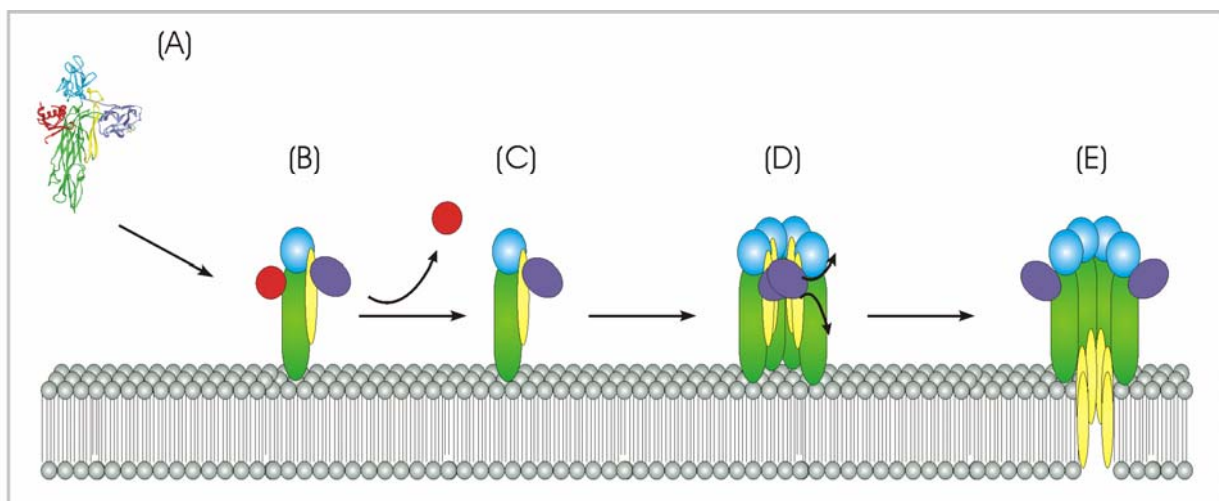
Der Mechanismus der Porenbildung von  $\beta$ -PFTs ist vermutlich für viele Mitglieder dieser Gruppe gleich und konnte für einige Toxine im Detail charakterisiert werden. Das am besten untersuchte Beispiel ist  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*. Das Toxin wird als wasserlösliches Monomer sezerniert, bindet als Monomer an Membranen und oligomerisiert zu einer nicht-lytischen Prä-Pore, deren porenbildenden Stem-Regionen anschließend in die Membran inserieren und die heptamere Poren bilden (Valeva et al. 1997; Walker et al., 1992). Die Formierung von Präporen-Komplexen auf der Membran stellt dabei eine verbreite Zwischenstufe der Porenbildung von Toxinen dar. Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Toxin konnte bislang weder für VCC noch für Aerolysin ein Prä-Poren Komplex nachgewiesen werden (Zitzer et al., 2000; Parker et al., 1994). Zum Nachweis dieser nicht-lytischen Zwischenstufe bei der Porenbildung von VCC, wurden von Zitzer und Kollegen mehrere Ansätze verfolgt (Zitzer et al., 2000). Da die Aktivität von VCC bei niedriger Temperatur inhibiert und die Insertion in die Membran verhindert wird, oligomerisiert das Toxin zu Prä-Poren und der Nachweis der Prä-Pore wird ermöglicht. Des Weiteren ist die lytische Aktivität von VCC nicht nur von der gewählten Temperatur abhängig, sondern sowohl von Cholesterol (Ikigai et al., 1996) als auch Ceramiden (Zitzer et al., 1999) in der Ziellmembran. Dennoch konnten weder bei 4°C noch auf Membranen ohne Cholesterol Prä-Poren von VCC nachgewiesen werden (Zitzer et al., 2000). Eine andere Strategie zur gezielten Kontrolle der Porenbildung ist die Einführung intra-molekularer Disulfidbrücken, die das Inserieren der Pre-Stem Regionen in die Membran verhindern (Hotze et al., 2001; Nguyen et al., 2002; Kawate & Gouaux, 2003; Valeva et al., 2001). Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich bei anderen  $\beta$ -PFTs sowie Cholesterol-dependent Cytolysinen (CDCs) zum Nachweis des Prä-Poren Komplexes angewandt (Shepard et al., 2000). Bei dieser Methode werden essentielle Domänen durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft und der Vorgang der Porenbildung unterbrochen. Die Kristallstruktur des VCC-Monomers (Olson & Gouaux, 2005) sowie die strukturellen Daten des Oligomers (3,5 Å) verdeutlichen, dass zur Insertion der Pre-Stem Region erhebliche

konformationelle Änderungen notwendig sind. Im Monomer befinden sich die beiden C-terminalen Lektin-Domänen, insbesondere  $\beta$ -Prism, in räumlicher Nähe zur inserierenden porenbildenden Region, verändern allerdings bei der Insertion in Membranen ihre Position. Aufgrund der Kristallstruktur wurden daher verschiedene Doppelcysteinmutanten konstruiert, die jeweils einen Cystein-Rest in der Pre-Stem Region und in einer der beiden Lektin-Domänen enthalten. Durch das Einführen dieser zusätzlichen künstlichen intramolekularen Disulfidbrücke werden im Monomer die C-terminalen Domänen mit der porenbildenden Region verknüpft. Da während der Porenbildung und zur Insertion der Pre-Stem-Sequenz, strukturelle Änderungen notwendig sind und unter anderem die Position der  $\beta$ -Prism-Domäne verändert werden muss, verhindert die intramolekulare Disulfidbrücke die Insertion der porenbildenden Sequenz. Durch die Reduktion der künstlichen Disulfidbrücke hingegen wird die Insertion des Pre-Stems ermöglicht und die Funktionalität des Toxins wiederhergestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit führte die Bildung einer künstlicher Disulfidbrücken bei VCC zum Verlust der hämolytischen Aktivität. Für das Fehlen der Porenbildung kommen drei mögliche Ursachen in Betracht: Erstens, die Bindung an Membranen wird durch die Disulfidbrücke inhibiert; zweitens, nicht die Bindung wird inhibiert, sondern die Oligomerisierung des gebundenen Toxins; drittens, das gebundene Toxin oligomerisiert, bildet aber SDS-labile Oligomere auf Membranen. Das Ausmaß der Bindung wurde in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten bestimmt und ist unabhängig davon, ob eine Disulfidbrücke zwischen der Pre-Stem Region und der C-terminalen Domäne ausgebildet wird. Interaktionsstellen des Toxins mit der Membran werden demnach durch die künstliche Disulfidbrücke nicht beeinträchtigt. Obwohl die Bindung unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch die Disulfidbrücke nicht beeinflusst wird, sind alle untersuchten VCC-Derivate unter diesen Bedingungen hämolytisch inaktiv. Da durch die Reduktion der Disulfidbrücke die hämolytische Aktivität wiederhergestellt und SDS-stabile Oligomere nachgewiesen wurden, resultiert der Verlust der hämolytischen Aktivität nicht auf einer veränderten Struktur der VCC-Derivate im Vergleich zum Wild-Typ. Daher wird angenommen, dass die eingeführte Disulfidbrücke spezifisch die porenbildende Region mit der C-terminalen Lektin-ähnlichen Domäne verknüpft und den Pre-Stem an der Insertion in die Membran hindert. Der Nachweis SDS-labiler Oligomere auf Membranen erfolgte durch die Verwendung eines Cross-Linkers und demonstrierte, dass die Oligomerisierung des Toxins durch die künstliche Disulfidbrücke ebenfalls nicht beeinträchtigt wurde, sondern lediglich die Insertion des Pre-Stems in die Membran verhindert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zuerst die Oligomerisierung zu

einem Prä-Poren Komplex stattfindet, gefolgt von der Insertion und Porenbildung. Die Bildung gemischter Oligomere aus aktivem Toxin und des arretierten Derivates ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Fähigkeit des Toxins auf Membranen zu oligomerisieren nicht beeinträchtigt wurde. Sowohl die hämolytische Aktivität des aktiven Toxins als auch die SDS-Stabilität gemischten Oligomere wird durch die Inkorporation des nicht-lytischen Toxins stufenweise reduziert. Dass unter keinen Bedingungen Oligomere mit unterschiedlicher Anzahl an Protomeren nachgewiesen wurden, und die SDS-Stabilität gemischter Oligomere reduziert wird, deutet auf die Existenz eines Prä-Poren Stadiums hin. Die Insertion des aktiven Toxins in die Membran wurde fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen, und Heteroheptamere aus aktivem Toxin und dem insertionsdefizienten VCC-Derivat bilden Poren mit einem kleineren funktionellen Durchmesser als der Wild-Typ. Im Gegensatz zur Insertion von  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus*, einem kooperativen Prozess (Valeva et al., 1997), erfolgt die Insertion der porenbildenden Regionen bei VCC durch den Kontakt der einzelnen Protomere untereinander, unabhängig davon, ob einzelne Protomere selbst in die Membran inserieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit zum ersten Mal ein Prä-Poren Stadium bei VCC, und somit für ein  $\beta$ -PFT aus einem Gram-negativen Bakterium, erfolgreich nachgewiesen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein gemeinsamer, konservierter Mechanismus der Porenbildung bei Cytolysinen im Reich der Prokaryoten existiert (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Postulierter Mechanismus der Porenbildung von *Vibrio cholerae* Cytolysin.**

ProVCC wird als wasserlösliches Monomer sezerniert (A) und bindet als Monomer an Membranen (B). Die Pro-Region (rot) verhindert die Oligomerisierung des gebundenen Toxins. Nach der Aktivierung des Toxins durch die Spaltung der N-terminalen Pro-Region (Pfeil), oligomerisiert das Toxin (C) zu einem Prä-Poren Komplex (D). Strukturelle Änderungen führen zur Insertion der Pre-Stem Regionen und zur Bildung der transmembranären Pore (E). Zur besseren Übersicht sind nicht alle sieben Protomere in der Abbildung dargestellt.

*Vibrio cholerae* Cytolysin bindet als Monomer an Membranen, wobei die cytolytische Domäne (grün) mit der Membran interagiert und eine Bindung an Zuckerrezeptoren, vermutlich über  $\beta$ -Prism oder  $\beta$ -Trefoil, postuliert wird. Die Oligomerisierung der membrangebundenen Monomere wird zum einen durch die N-terminale Pro-Region verhindert, zum anderen erfordert die Oligomerisierung eine Veränderung der Position der beiden C-terminalen Domänen, da insbesondere die  $\beta$ -Prism Domänen sterisch überlappen und die Insertion der Pre-Stem Regionen in die Membran verhindern.

#### 4.2. Funktion der beiden C-terminalen Domänen $\beta$ -Trefoil und $\beta$ -Prism

*Vibrio cholerae* Cytolysin wird als Pro-Toxin mit einem Molekulargewicht von 79 kDa sezerniert, und durch verschiedene Proteasen zu reifem Toxin (65 kDa) am N-Terminus aktiviert (Nagamune et al., 1996; Yamamoto et al., 1990). Neben der cytolytischen Domäne enthält aktiviertes VCC zwei globuläre C-terminale Domänen mit jeweils etwa 15 kDa. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen sezerniert *Vibrio cholerae* O1 N86 zusätzlich zu diesem 65-kDa Toxin ein etwa 50 kDa großes Protein, dessen N-terminale Sequenz mit der des 65-kDa Toxins übereinstimmt (Ikigai et al., 1996). Auf Liposomen oligomerisieren diese beiden Formen zusammen zu unterschiedlich großen gemischten Oligomeren, deren Molekulargewicht zwischen 180 und 280 kDa variiert. Oligomere, die lediglich aus dem größeren 65 kDa Toxin gebildet werden, dissoziieren durch Trypsinierung und Erhitzen zu monomerem Toxin mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass beide Toxine von ein und demselben Vorläufer abstammen, und bei der 50 kDa-großen Form zusätzlich etwa 15 kDa des C-Terminus, das entspricht der  $\beta$ -Prism Domäne, entfernt wurden (Ikigai et al., 1999). Auch andere *Vibrio cholerae* Stämme produzieren VCC-Monomere mit einem Molekulargewicht zwischen 50 und 52 kDa, die in Membranen oligomerisieren und Poren bilden (Zitzer et al., 1995; Menzl et al., 1996). Die genaue Rolle dieser C-terminal verkürzten Proteine bei der Pathogenese von *V. cholerae* ist bislang jedoch noch nicht geklärt, da die Isolierung des 50 kDa-Toxins allein aus dem Kulturüberstand noch nicht erfolgreich durchgeführt wurde.

Verschiedene Studien zeigten, dass auch andere *Vibrio*-Stämme, wie zum Beispiel *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus* oder *V. anguillarum*, Cytolysine produzieren, deren Sequenzen Homologien zu VCC aufweisen (Ichinose et al., 1987; Yamamoto et al., 1990; Hirono et al., 1996; Ikigai et al., 1996; Kim et al., 1997; Rahman et al., 1997; Choi et al., 2002; Han et al., 2002; Kothary et al., 2003). Besonders die cytolytische Domäne dieser Toxine ist stark konserviert und alle Toxine enthalten jeweils drei Disulfidbrücken, sowie eine  $\beta$ -Trefoil Domäne. Das Hämolyysin von *V. vulnificus* stellt eine Besonderheit dar, da es weder eine N-terminale Pro-Region noch eine C-terminale Prism-Domäne besitzt. Die Sequenzidentität zwischen VFH (*Vibrio fluvialis* Hämolyysin) aus *Vibrio fluvialis* und VCC beträgt 71% (Han et al., 2002) und auch die C-terminale Region (Aminosäure Asp<sup>494</sup> bis Asn<sup>740</sup>) dieser beiden Toxine ist stark konserviert (66%) (Abbildung 27). Die Deletion von 70





Wie für VFH beschrieben (Han et al., 2002), führt auch die Deletion der C-terminalen  $\beta$ -Prism-Domäne bei VCC in dieser Arbeit zu einem kompletten Verlust der hämolytischen Aktivität. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch das gezielte Entfernen der C-terminalen Domäne nach der Renaturierung sowie der Produktion des Toxins in löslicher Form gezeigt werden, dass diese Inaktivität nicht auf der Denaturierung/Renaturierung des Toxins beruht. Olson & Gouaux (2005) produzierten ebenfalls ein C-terminal verkürztes VCC-Derivat, dessen hämolytische Aktivität um etwa Faktor zehn reduziert wurde. Im Gegensatz zu dem in diese Arbeit beschriebenen VCC-Derivat, wurden bei diesem C-terminal verkürzten Protein lediglich zwei Aminosäuren weniger deletiert. Tatsächlich führte auch der Austausch von lediglich drei Aminosäuren (D642, Y679 und Y704) im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der C-terminalen  $\beta$ -Prism Domäne zu einer reduzierten hämolytischen Aktivität des Toxins.

Sowohl für VCC als auch  $\alpha$ -Toxin aus *Staphylococcus aureus* werden zwei verschiedene Bindungsstellen für die Toxin-Bindung an Kaninchen Erythrozyten postuliert. Im Gegensatz zu humanen Erythrozyten sind Kaninchen Erythrozyten wesentlich sensitiver (Zitzer et al., 1997), bei  $\alpha$ -Toxin etwa um Faktor 16.000 (Hildebrand, et al., 1991). Bindungsstudien mit Erythrozyten aus beiden Spezies zeigten, dass beide Toxine bei der Bindung an die empfindlicheren Kaninchen Erythrozyten bei niedrigen Konzentrationen mit einer geringen Zahl spezifischer Bindungsstellen interagieren. Diese hoch-affinen Bindungsstellen, bei VCC etwa 2000/Zelle, ermöglichen die effiziente Bindung des Toxins auch bei niedrigen Konzentrationen (Zitzer et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist die Bindung der beiden Toxine an humane Erythrozyten nicht spezifisch und sowohl für die Bindung als auch die Hämolyse der Zellen sind wesentlich höhere Toxin-Konzentrationen notwendig. Obwohl  $\alpha$ -Toxin und die cytolytische Domänen von VCC strukturelle Ähnlichkeiten besitzen und in einer ähnlichen Weise an Kaninchen und humane Erythrozyten binden, wird die Bindung von VCC an Membranen durch die Zugabe von  $\alpha$ -Toxin nicht beeinträchtigt (Zitzer et al., 1997). Demnach interagieren diese beiden Toxine nicht mit denselben Bindungsstellen auf Membranen.

Die  $\beta$ -Prism-Domäne besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu verschiedenen Pflanzen-Lektinen wie zum Beispiel *Maclura pomifera* Agglutinin (MPA) (Lee et al., 1998) oder Jacalin (Sankaranarayanan et al., 1996). Das für die Kristallisation des Pro-Toxins von VCC notwendige  $\beta$ -Octylglykosid wird in einer Region gebunden, in der auch diese beiden Proteine, MPA und Jacalin, verschiedene Zucker binden. Besonders drei Aminosäuren, bei

VCC Aspartat 642, sowie die beiden Tyrosin-Reste 679 und 704, interagieren über Wasserstoffbrücken mit Hydroxylgruppen der Zucker bzw. mit dem Zuckerring. Obwohl der VCC-Rezeptor bislang nicht identifiziert wurde, führt das Blockieren von Glykophorin B, einem transmembranen Sialoglykoprotein, auf humanen Erythrozyten zu einer reduzierten Anfälligkeit der Zellen gegenüber VCC (Zhang et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die fehlende hämolytische Aktivität des  $\Delta\beta$ -Prism- und des TEV1-Derivates nach der Spaltung durch die TEV-Protease, auf der reduzierten Bindung des Toxins an Membranen beruht. Des Weiteren wurde die Rolle von drei Aminosäuren (Aspartat 642, Tyrosin 679 und 704) innerhalb der  $\beta$ -Prism-Domäne bei der Bindung an Membranen bestätigt. Der Austausch allein dieser drei Aminosäuren führt zu einer Reduzierung der Bindung an Membranen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die C-terminale  $\beta$ -Prism Domäne bei der Bindung von *Vibrio cholerae* Cytolysin an Kaninchen Erythrozyten beteiligt ist. Da die Deletion von lediglich drei Aminosäure-Resten innerhalb dieser Domäne zu einer stark reduzierten Bindung führt, und in bisherigen Studien eine Interaktion dieser Reste mit  $\beta$ -Octylglykosid nachgewiesen werden konnte, interagiert diese Region vermutlich mit zuckerhaltigen Strukturen auf der Membran. Falls VCC aufrecht (siehe Abbildung 26) an Membranen bindet, wäre die C-terminale  $\beta$ -Prism Domäne etwa 60 Å von der Membran entfernt, und könnte mit gestreckten Glykoproteinen auf der Zelloberfläche interagieren.

$\alpha$ -Toxin und LukF aus *Staphylococcus aureus* besitzen beide eine Lipidbindungs-Tasche, die durch ein Tryptophan-Arginin Paar innerhalb eines Loops der Rim-Domäne gebildet wird. Diese Reste sind essentiell für die Bindung der Toxine an Erythrozyten-Membranen und an Lipide mit Phosphocholin-Kopfgruppen (Walker & Bayley, 1995). VCC fehlt diese entsprechende Lipidbindungs-Tasche, wodurch die reduzierte Bindung von VCC an Membranen mit Phosphatidylcholin zumindest zum Teil erklärt wird. Dennoch besitzt VCC innerhalb dieser Domäne eine Vielzahl aromatischer Aminosäure-Reste, die die Funktion der Lipidbindung übernehmen können. Der Austausch der Aminosäuren D642, Y679 und Y704 innerhalb der  $\beta$ -Prism Domäne führt zu einer Reduktion der hämolytischen Aktivität, durch den zusätzlichen Austausch einer weiteren Aminosäure innerhalb der cytolytischen Domäne, W387, wird die Aktivität des Toxins hingegen verhindert. Daher ist nicht auszuschließen, dass Aminosäure-Rest W387 an der Bindung des Toxins an Lipide beteiligt ist.

Sequenzanalysen deuteten darauf hin, dass die zweite C-terminale Domäne,  $\beta$ -Trefoil, eine Lektin-ähnliche Faltung besitzt. Aufgrund der Strukturhomologie zur B-Domäne von Ricin, die eine Zucker-Bindungsstelle besitzt, wurde eine Interaktion dieser Domäne mit Zuckerrezeptoren auf der Membran postuliert (Loris, 2002; Olson & Gouaux, 2005). Hingegen wurde bei der Kristallisation von VCC mit verschiedenen Zuckern kein Hinweis auf eine Zuckerbindungsstelle gefunden. Die Annahme, dass  $\beta$ -Trefoil die Bindung an Zuckerrezeptoren nicht vermittelt, wurde in dieser Arbeit bestätigt. Das Ausmaß der Bindung, sowohl von ProVCC als auch VCC, ist ohne diese Domäne vergleichbar mit dem Wild-Typ Toxin. Allerdings wird die Anfälligkeit der Toxine gegenüber Proteasen nach der Deletion dieser Domäne drastisch erhöht. Die Struktur des VCC-Monomers und die Position der  $\beta$ -Trefoil Domäne bietet eine mögliche Erklärung für die erhöhte proteolytische Degradation des Toxins. Die partielle Entfaltung von VCC durch die Zugabe von 2 M Harnstoff führt zu einer verringerten Resistenz des Toxins gegen Trypsin und Chymotrypsin, und eine zusätzliche Bande (mit etwa 50 kDa) im SDS-Gel zu erkennen ist (Chattopadhyay et al., 2002). Möglicherweise wird die Spaltung durch Trypsin durch die Anwesenheit der  $\beta$ -Trefoil Domäne sterisch verhindert und das Toxin so geschützt. Bei fehlender Domäne wird die Spaltstelle zugänglich und führt zum Verlust des protektiven Schutz vor Proteasen und damit der proteolytischen Degradation des Toxins. Obwohl die Bindung des Toxins an Membranen durch die Deletion von  $\beta$ -Trefoil nicht beeinträchtigt wird, ist die spontane Spaltung des Pro-Toxins durch Erythrozyten-Proteasen eingeschränkt und erklärt die fehlende Aktivität des Pro-Toxins. Unklar ist jedoch, warum die Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne zu einer Aggregation der Kaninchen Erythrozyten nach Zugabe des Pro-Toxins führt. Da die Bindung des Toxins an Membranen durch die Deletion nicht beeinträchtigt wird, interagieren möglicherweise zwei oder mehrere gebundene Toxinmoleküle, wodurch die Erythrozyten miteinander verknüpft werden und aggregieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit zum ersten Mal die Bedeutung der  $\beta$ -Prism Domäne des *Vibrio cholerae* Cytolysins bei der Bindung sowohl von VCC als auch ProVCC an Membranen dargestellt, und damit auch zu ersten Mal eine quantitative Bindungsstudie des 50 kDa-Toxins durchgeführt. Die Oligomerisierung der von *Vibrio cholerae* produzierten 50 kDa-Form auf Membranen (Zitzer et al., 1997), bestätigt die Vermutung, dass nicht ausschließlich die C-terminale  $\beta$ -Prism Domäne die Bindung von VCC an Membranen vermittelt, sondern eine weitere Region, vermutlich die cytotolytische Domäne und eventuell

Aminosäure W387, eine Rolle spielt. Aufgrund der starken Homologie von VCC zu anderen *Vibrio*-Cytolysinen, die bis auf eine Ausnahme alle diese C-terminale Domäne besitzen, ist anzunehmen, dass diese Region auch bei der Interaktion dieser Toxine an Membranen eine essentielle Rolle spielt. Die Funktion der  $\beta$ -Trefoil Domäne hingegen ist nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Region sowohl auf die Bindung von VCC als auch ProVCC an Kaninchen Erythrozyten keinen Einfluss hat. Die Deletion von  $\beta$ -Trefoil führt zu einer Inhibierung der spontanen Spaltung nach der Bindung an Membranen durch Proteasen, reduziert aber gleichzeitig die Proteasestabilität des Toxin in Lösung.

## 5. Zusammenfassung

Pathogene *Vibrio cholerae*-Stämme sekretieren VCC, ein Cytolysin das zur Gruppe der  $\beta$ -PFTs gehört und Erythrozyten sowie humane Zellen lysiert. VCC wird als wasserlösliches Monomer sekretiert, das durch das Entfernen des N-Terminus proteolytisch aktiviert wird. Nach der Bindung an Membranen oligomerisiert das aktive monomere Toxin zu einem Heptamer, das durch die Insertion der porenbildenden Sequenzen jedes Protomers eine lytische  $\beta$ -Barrel bildet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal für VCC erfolgreich ein Prä-Porenstadium als Zwischenstufe der Porenbildung nachgewiesen. Die Oligomerisierung zu einer nicht-lytischen Struktur erfolgt demnach vor der Insertion der porenbildenden Sequenzen in die Membran. Damit ist VCC das erste Mitglied der  $\beta$ -PFTs, das von Gram-negativen Bakterien produziert wird und zu einer Prä-Pore oligomerisiert. Diese Ergebnisse deuten auf einen archetypischen Mechanismus der Porenbildung hin.

Innerhalb gemischter Oligomere wird die Insertion des aktiven Toxins durch die Inkorporation des insertionsdefizienten Toxins nicht verhindert, und führt zur Bildung von Poren mit reduziertem funktionellen Durchmesser. Allerdings überwiegt der SDS-labile Phenotyp des insertionsdefizienten Toxins mit steigenden Konzentrationen, wodurch die SDS-Stabilität dieser Heterooligomere reduziert wird.

VCC besitzt zwei C-terminale globuläre Domänen, deren Funktion bislang wenig untersucht wurde. Die proteolytische Aktivierung des Pro-Toxins durch Erythrozyten-Proteasen wird durch die Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne stark reduziert und führt daher zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität. Die Deletion der  $\beta$ -Trefoil Domäne führt bei aktiviertem Toxin zu einer um etwa Faktor sieben reduzierten hämolytischen Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin durch Bindungsstudien verschiedener verkürzter VCC-Derivate gezeigt, dass die  $\beta$ -Trefoil-Domäne bei der Bindung an Membranen keine essentielle Rolle spielt. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass diese Domäne für die Stabilität des Toxins gegenüber verschiedener Proteasen verantwortlich ist.

Die zweite C-terminale  $\beta$ -Prism-Domäne ist essentiell für die Aktivität sowohl von VCC als ProVCC. Die Deletion eines 15kDa-großen C-terminalen Fragmentes verhindert die Bindung des Toxins an Membranen und führt somit zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die essentielle Bedeutung von drei Aminosäuren, Aspartat 642, Tyrosin 679 und Tyrosin 704, für die Bindung an Membranen gezeigt.

## 6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Porenbildung von VCC weiter charakterisiert, jedoch ist die Rolle von Cholesterol bei diesem Prozess weiterhin unklar. Um zu klären ob Cholesterol für die Oligomerisierung oder Insertion des Toxins essentiell ist, könnte auf die in dieser Arbeit generierten insertionsdefizienten VCC-Derivate E322C/Q619C\* bzw. G327C/A601C\* zurückgegriffen werden. Um zu prüfen, ob die Interaktion von VCC mit Cholesterol zu einer Änderung der Konformation des Toxins führt, und diese erst die Insertion der porenbildenden Sequenzen in die Membran ermöglicht, könnte das Doppelcystein-Derivat mit Cholesterol-haltigen Membranen und Membranen ohne Cholesterol inkubiert werden. Die Verwendung des Cross-Linkers BS<sup>3</sup> würde die chemische Stabilisierung SDS-labiler Oligomere ermöglichen. Ist das insertionsdefiziente Toxin nicht dazu in der Lage auf Membranen ohne Cholesterol zu oligomerisieren, würde die Bindung des Toxins an Cholesterol zu einer Konformationsänderung führen, wodurch die Oligomerisierung des Toxins erst ermöglicht würde. Könnten auch auf Membranen ohne Cholesterol SDS-labile Oligomere nachgewiesen werden, wäre Cholesterol erst für die Insertion der porenbildenden Sequenzen in die Membran essentiell.

Des Weiteren könnten zusätzliche Doppelcystein-Derivate konstruiert werden, um den Einfluss von Cholesterol auf die Konformation des Toxins zu untersuchen. Ein Cystein-Rest könnte in die porenbildenden Sequenz, ein weiterer in eine der beiden C-terminalen Domänen eingeführt werden, und die freien Cystein-Reste mit Pyren-Maleimid markiert. Befänden sich diese beiden derivatisierten Reste im Monomer in räumliche Nähe zueinander, könnte der Fluorophor Excimere bilden, die nach der Insertion in die Membran verschwinden. Es werden Spektren bei 4°C, Bedingungen bei denen VCC oligomerisiert aber keine Pore bildet, und bei 37°C aufgenommen, um Konformationsänderungen während der Oligomerisierung bzw. Porenbildung nachvollziehen zu können.

Die Bindung von VCC an zuckerhaltige Strukturen, wie zum Beispiel Glykolipide oder Glykoproteine, wird vermutlich über die C-terminale  $\beta$ -Prism-Domäne vermittelt. An der Interaktion sind voraussichtlich drei Aminosäurereste (D642, Y679 und Y704) beteiligt. Da ProVCC jedoch auch an Liposomen bindet, wird eine zweite Bindungsdomäne für Membranlipide postuliert. Dabei könnte unter anderem die Rolle des Tryptophan-Restes 387 an der Bildung einer Lipidbindungs-Tasche untersucht werden, indem lediglich dieser Rest durch Alanin substituiert wird und die Bindung des Toxin-Derivats an Membranen quantifiziert wird.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G. & 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**, 525-540.

**Alouf JE & Freer JH** (1999) The comprehensive Sourcebook of bacterial protein toxins. *Academic Press*

**Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F. & McKay, D.B.** (1986) Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1320-1324.

**Anderluh, G. & Macek, P.** (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **40**, 111-124.

**Athanasiadis, A., Anderluh, G., Macek, P. & Turk, D.** (2001) Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure* **9**, 341-346.

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

**Baumann, P., Furniss, A.L., and Lee, J.V.** (1984) Genus I. *Vibrio*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, N.R. Krieg (Ed.), p. 518-538. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

**Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Gutierrez Aguirre, I., Darji, A., Chakraborty, T., Macek, P., Lakey, J.H., Weiss, S. & Anderluh, G.** (2007) Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of Listeriolysin O. *Biochemistry* **46**, 4425-4437.

**Belmonte, G., Pederzoli, C., Macek, P. & Menestrina, G.** (1993) Pore formation by the sea anemone cytolysin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. *J Membr Biol* **131**, 11-22.

**Benson, E.L., Huynh, P.D., Finkelstein, A. & Collier, R.J.** (1998) Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry* **37**, 3941-3948.

**Bhakdi, S. & Trantum-Jensen, J.** (1987) Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **107**, 147-223.

**Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D.C., Johnson-Vroom, K.E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A.G., Aronow, B.J., Ghosh, G., Rickert, R.C. & Karin, M.** (2004) Activation of IKK $\alpha$  target genes depends on recognition of specific  $\kappa$ B binding sites by RelB:p52 dimers. *Embo J* **23**, 4202-4210.

**Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N.E.** (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**, 761-771.

**Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S. & Soberon, M.** (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* **1667**, 38-46.

**Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.T. & Dobberstein, B.** (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol* **155**, 416-433.

**Chattopadhyay, K., Bhattacharyya, D. & Banerjee, K.K.** (2002) *Vibrio cholerae* hemolysin. Implication of amphiphilicity and lipid-induced conformational change for its pore-forming activity. *Eur J Biochem* **269**, 4351-4358.



- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J. & Eisenberg, D.** (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357**, 216-222.
- Choi, H.K., Park, N.Y., Kim, D.I., Chung, H.J., Ryu, S. & Choi, S.H.** (2002) Promoter analysis and regulatory characteristics of vvhBA encoding cytolytic hemolysin of *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem* **277**, 47292-47299.
- Cossart, P. & Sansonetti, P.J.** (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**, 242-248.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J. & Lecuit, M.** (2003) Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* **13**, 23-31.
- Dalsgaard, A., Albert, M.J., Taylor, D.N., Shimada, T., Meza, R., Serichantalergs, O. & Echeverria, P.** (1995) Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J Clin Microbiol* **33**, 2715-2722.
- Datta-Roy, K., Banerjee, K., De, S.P. & Ghose, A.C.** (1986) Comparative study of expression of hemagglutinins, hemolysins, and enterotoxins by clinical and environmental isolates of non-O1 *Vibrio cholerae* in relation to their enteropathogenicity. *Appl Environ Microbiol* **52**, 875-879.
- Fang, Y., Cheley, S., Bayley, H. & Yang, J.** (1997) The heptameric prepore of a staphylococcal alpha-hemolysin mutant in lipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biochemistry* **36**, 9518-9522.
- Galanos, C., Roppel, J., Weckesser, J., Rietschel, E.T. & Mayer, H.** (1977) Biological activities of lipopolysaccharides and lipid A from Rhodospirillaceae. *Infect Immun* **16**, 407-412.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W. & English, L.** (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1101-1109.
- Gekara, N.O. & Weiss, S.** (2008) Mast cells initiate early anti-*Listeria* host defences. *Cell Microbiol* **10**, 225-236.
- Giddings, K.S., Johnson, A.E. & Tweten, R.K.** (2003) Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11315-11320.
- Gekara, N.O. & Weiss, S.** (2004) Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochem Soc Trans* **32**, 712-714.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F.G. & Freche, B.** (2008) Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci* **65**, 493-507.
- Gouaux, E., Hobaugh, M. & Song, L.** (1997) alpha-Hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci* **6**, 2631-2635.
- Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prevost, G. & Mourey, L.** (2004) Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J Biol Chem* **279**, 41028-41037.
- Gutierrez, M.G., Saka, H.A., Chinen, I., Zoppino, F.C., Yoshimori, T., Bocco, J.L. & 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**, 1829-1834.
- Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Podlesek, Z., Macek, P., Anderluh, G. & Gonzalez-Manas, J.M.** (2004) Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem J* **384**, 421-428.
- Hall, R.H. & Drasar, B.S.** (1990) *Vibrio cholerae* HlyA hemolysin is processed by proteolysis. *Infect Immun* **58**, 3375-3379.
- Han, J.H., Lee, J.H., Choi, Y.H., Park, J.H., Choi, T.J. & Kong, I.S.** (2002) Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1599**, 106-114.

- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harris, J.R., Bhakdi, S., Meissner, U., Scheffler, D., Bittman, R., Li, G., Zitzer, A. & Palmer, M.** (2002) Interaction of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) with cholesterol, some cholesterol esters, and cholesterol derivatives: a TEM study. *J Struct Biol* **139**, 122-135.
- Hildebrand, A., Pohl, M. & Bhakdi, S.** (1991) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. *J Biol Chem* **266**, 17195-17200.
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K. & Kang, C.** (2004) Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol Microbiol* **51**, 711-720.
- Hirono, I., Masuda, T. & Aoki, T.** (1996) Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb Pathog* **21**, 173-182.
- Honda, T. & Finkelstein, R.A.** (1979) Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect Immun* **26**, 1020-1027.
- Hong, Q., Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Macek, P., Turk, D., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H. & Anderluh, G.** (2002) Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J Biol Chem* **277**, 41916-41924.
- Hotze, E.M., Wilson-Kubalek, E.M., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E. & Tweten, R.K.** (2001) Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J Biol Chem* **276**, 8261-8268.
- Husmann, M., Dersch, K., Bobkiewicz, W., Beckmann, E., Veerachato, G. & 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**, 1128-1134.
- Iacovache, I., van der Goot, F.G. & Pernot, L.** (2008) Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1611-1623.
- Iacovache, I., Paumard, P., Scheib, H., Lesieur, C., Sakai, N., Matile, S., Parker, M.W. & van der Goot, F.G.** (2006) A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *Embo J* **25**, 457-466.
- Ichinose, Y., Yamamoto, K., Nakasone, N., Tanabe, M.J., Takeda, T., Miwatani, T. & Iwanaga, M.** (1987) Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **55**, 1090-1093.
- Ikigai, H., Ono, T., Nakae, T., Otsuru, H. & Shimamura, T.** (1999) Two forms of *Vibrio cholerae* O1 El Tor hemolysin derived from identical precursor protein. *Biochim Biophys Acta* **1415**, 297-305.
- Ikigai, H., Akatsuka, A., Tsujiyama, H., Nakae, T. & Shimamura, T.** (1996) Mechanism of membrane damage by El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* **64**, 2968-2973.
- Issartel, J.P., Koronakis, V. & Hughes, C.** (1991) Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* **351**, 759-761.
- Kawate, T. & Gouaux, E.** (2003) Arresting and releasing *Staphylococcal* alpha-hemolysin at intermediate stages of pore formation by engineered disulfide bonds. *Protein Sci* **12**, 997-1006.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A. & Berche, P.** (1999) Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol Microbiol* **31**, 1709-1722.
- Kim, G.T., Lee, J.Y., Huh, S.H., Yu, J.H. & Kong, I.S.** (1997) Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*. *Biochim Biophys Acta* **1360**, 102-104.
- Koschinski, A., Repp, H., Unver, B., Dreyer, F., Brockmeier, D., Valeva, A., Bhakdi, S. & Walev, I.** (2006) Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells--the pore is on its own. *Faseb J* **20**, 973-975.

- Kothary, M.H., Lowman, H., McCardell, B.A. & Tall, B.D.** (2003) Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. *Infect Immun* **71**, 3213-3220.
- Lakey, J.H. & Slatin, S.L.** (2001) Pore-forming colicins and their relatives. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**, 131-161.
- Laohachai, K.N., Bahadi, R., Hardo, M.B., Hardo, P.G. & Kourie, J.I.** (2003) The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea. *Toxicon* **42**, 687-707.
- Lee, X., Thompson, A., Zhang, Z., Ton-that, H., Biesterfeldt, J., Ogata, C., Xu, L., Johnston, R.A. & Young, N.M.** (1998) Structure of the complex of Maclura pomifera agglutinin and the T-antigen disaccharide, Galbeta1,3GalNAc. *J Biol Chem* **273**, 6312-6318.
- Li, J.D., Carroll, J. & Ellar, D.J.** (1991) Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**, 815-821.
- Loris, R.** (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* **1572**, 198-208.
- Ludwig, A., Bauer, S., Benz, R., Bergmann, B. & Goebel, W.** (1999) Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **31**, 557-567.
- Lugtenberg, B. & Van Alphen, L.** (1983) Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **737**, 51-115.
- Madden, J.C., Ruiz, N. & Caparon, M.** (2001) Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* **104**, 143-152.
- Malovrh, P., Viero, G., Serra, M.D., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G. & Anderluh, G.** (2003) A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem* **278**, 22678-22685.
- Mancheno, J.M., Martin-Benito, J., Martinez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G. & Hermoso, J.A.** (2003) Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* **11**, 1319-1328.
- Martinon, F. & Tschopp, J.** (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**, 447-454.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J.** (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-426.
- Medzhitov, R.** (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145.
- Menzl, K., Maier, E., Chakraborty, T. & Benz, R.** (1996) HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. *Eur J Biochem* **240**, 646-654.
- Montoya, M. & Gouaux, E.** (2003) Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 19-27.
- Moors, M.A., Auerbuch, V. & Portnoy, D.A.** (1999) Stability of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells is regulated by the N-end rule pathway. *Cell Microbiol* **1**, 249-257.
- Musse, A.A. & Merrill, A.R.** (2003) The molecular basis for the pH-activation mechanism in the channel-forming bacterial colicin E1. *J Biol Chem* **278**, 24491-24499.
- Nagamune, K., Yamamoto, K. & Honda, T.** (1997) Intramolecular chaperone activity of the pro-region of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin. *J Biol Chem* **272**, 1338-1343.

- Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T. & Honda, T.** (1996) *In vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect Immun* **64**, 4655-4658.
- Nelson, K.L., Raja, S.M. & Buckley, J.T.** (1997) The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem* **272**, 12170-12174.
- Nguyen, V.T., Higuchi, H. & Kamio, Y.** (2002) Controlling pore assembly of staphylococcal gamma-haemolysin by low temperature and by disulphide bond formation in double-cysteine LukF mutants. *Mol Microbiol* **45**, 1485-1498.
- Olson, R. & 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**, 997-1016.
- Olson, R. & Gouaux, E.** (2003) *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Sci* **12**, 379-383.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y. & Gouaux, E.** (1999) Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nat Struct Biol* **6**, 134-140.
- Parker, M.W. & Feil, S.C.** (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 91-142.
- Parker, M.W., van der Goot, F.G. & Buckley, J.T.** (1996) Aerolysin--the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol* **19**, 205-212.
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F. & Tsernoglou, D.** (1994) Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* **367**, 292-295.
- Pedelacq, J.D., Maveyraud, L., Prevost, G., Baba-Moussa, L., Gonzalez, A., Courcelle, E., Shepard, W., Monteil, H., Samama, J.P. & Mourey, L.** (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure* **7**, 277-287.
- Rahman, M.M., Miyoshi, S., Tomochika, K., Wakae, H. & Shinoda, S.** (1997) Analysis of the structural gene encoding a hemolysin in *Vibrio mimicus*. *Microbiol Immunol* **41**, 169-173.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L. & Weiser, J.N.** (2006) Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem* **281**, 12994-12998.
- Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S.C., Morton, C.J., Tweten, R.K. & Parker, M.W.** (2007) Structures of perfringolysin O suggest a pathway for activation of cholesterol-dependent cytolysins. *J Mol Biol* **367**, 1227-1236.
- Rossjohn, J., Buckley, J.T., Hazes, B., Murzin, A.G., Read, R.J. & Parker, M.W.** (1997) Aerolysin and pertussis toxin share a common receptor-binding domain. *Embo J* **16**, 3426-3434.
- Rutenber, E., Ready, M. & Robertus, J.D.** (1987) Structure and evolution of ricin B chain. *Nature* **326**, 624-626.
- Saha, N. & Banerjee, K.K.** (1997) Carbohydrate-mediated regulation of interaction of *Vibrio cholerae* hemolysin with erythrocyte and phospholipid vesicle. *J Biol Chem* **272**, 162-167.
- Saha, P.K., Koley, H., Mukhopadhyay, A.K., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Ramakrishnan, B.S., Krishnan, S., Takeda, T. & Takeda, Y.** (1996) Nontoxicogenic *Vibrio cholerae* 01 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of cases of cholera in southern India. *J Clin Microbiol* **34**, 1114-1117.

- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A. & Vijayan, M.** (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nat Struct Biol* **3**, 596-603.
- Schonherr, R., Hilger, M., Broer, S., Benz, R. & Braun, V.** (1994) Interaction of *Serratia marcescens* hemolysin (ShIA) with artificial and erythrocyte membranes. Demonstration of the formation of aqueous multistate channels. *Eur J Biochem* **223**, 655-663.
- Scobie, H.M. & Young, J.A.** (2005) Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Curr Opin Microbiol* **8**, 106-112.
- Sellman, B.R., Kagan, B.L. & Tweten, R.K.** (1997) Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol Microbiol* **23**, 551-558.
- Shepard, L.A., Shatursky, O., Johnson, A.E. & Tweten, R.K.** (2000) The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry* **39**, 10284-10293.
- Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E. & 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**, 20226-20231.
- Song, L., Hobough, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H. & Gouaux, J.E.** (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* **274**, 1859-1866.
- Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Walev, I. & 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**, 6171-6177.
- Tamm, L.K., Arora, A. & Kleinschmidt, J.H.** (2001) Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. *J Biol Chem* **276**, 32399-32402.
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C., Alvarez, C. & Menestrina, G.** (2001) Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J Membr Biol* **183**, 125-135.
- Tejuca, M., Serra, M.D., Ferreras, M., Lanio, M.E. & Menestrina, G.** (1996) Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* **35**, 14947-14957.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tilley, S.J. & Saibil, H.R.** (2006) The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol* **16**, 230-236.
- Tweten, R.K.** (2005) Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun* **73**, 6199-6209.
- Tweten, R.K., Parker, M.W. & Johnson, A.E.** (2001) The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**, 15-33.
- Uhlen, P., Laestadius, A., Jahnukainen, T., Soderblom, T., Backhed, F., Celsi, G., Brismar, H., Normark, S., Aperia, A. & Richter-Dahlfors, A.** (2000) Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. *Nature* **405**, 694-697.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H. & 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**, 26014-26021.

- Valeva, A., Walev, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Heinz, N., Hedderich, J., Lautwein, S., Mocking, M., Weis, S., Zitzer, A. & Bhakdi, S. (2005) Identification of the membrane penetrating domain of *Vibrio cholerae* cytolysin as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* **57**, 124-131.
- Valeva, A., Walev, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S. & Zitzer, A. (2004) A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J Biol Chem* **279**, 25143-25148.
- Valeva, A., Schnabel, R., Walev, I., Boukhallouk, F., Bhakdi, S. & Palmer, M. (2001) Membrane insertion of the heptameric staphylococcal alpha-toxin pore. A domino-like structural transition that is allosterically modulated by the target cell membrane. *J Biol Chem* **276**, 14835-14841.
- Valeva, A., Palmer, M. & Bhakdi, S. (1997) Staphylococcal alpha-toxin: formation of the heptameric pore is partially cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* **36**, 13298-13304.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S. & Palmer, M. (1996) Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *Embo J* **15**, 1857-1864.
- van der Goot, F.G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. & 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**, 8566-8570.
- Vetter, I.R., Parker, M.W., Tucker, A.D., Lakey, J.H., Pattus, F. & Tsernoglou, D. (1998) Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure* **6**, 863-874.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. & Bhakdi, S. (1995) Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *Embo J* **14**, 1607-1614.
- Walker, B. & Bayley, H. (1995) Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J Biol Chem* **270**, 23065-23071.
- Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L. & Bayley, H. (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* **267**, 21782-21786.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. & Stroud, R.M. (1997) Crystal structure of colicin Ia. *Nature* **385**, 461-464.
- Yamamoto, K., Wright, A.C., Kaper, J.B. & Morris, J.G., Jr. (1990) The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* E1 Tor hemolysin gene. *Infect Immun* **58**, 2706-2709.
- Yamamoto, K., Ichinose, Y., Nakasone, N., Tanabe, M., Nagahama, M., Sakurai, J. & Iwanaga, M. (1986) Identity of hemolysins produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and *V. cholerae* O1, biotype E1 Tor. *Infect Immun* **51**, 927-931.
- Yuldasheva, L.N., Merzlyak, P.G., Zitzer, A.O., Rodrigues, C.G., Bhakdi, S. & Krasilnikov, O.V. (2001) Lumen geometry of ion channels formed by *Vibrio cholerae* EL Tor cytolysin elucidated by nonelectrolyte exclusion. *Biochim Biophys Acta* **1512**, 53-63.
- Zakharov, S.D., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N. & Cramer, W.A. (2004) On the role of lipid in colicin pore formation. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 239-249.
- Zamenhof, P.J. & Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting - complementation of -galactosidase fragments in vivo. *J Bacteriol* **110**, 171-178.
- Zhang, D., Takahashi, J., Seno, T., Tani, Y. & Honda, T. (1999) Analysis of receptor for *Vibrio cholerae* E1 tor hemolysin with a monoclonal antibody that recognizes glycophorin B of human erythrocyte membrane. *Infect Immun* **67**, 5332-5337.

**Zhao, G. & London, E.** (2005) Behavior of diphtheria toxin T domain containing substitutions that block normal membrane insertion at Pro345 and Leu307: control of deep membrane insertion and coupling between deep insertion of hydrophobic subdomains. *Biochemistry* **44**, 4488-4498.

**Zitzer, A., Harris, J.R., Kemminer, S.E., Zitzer, O., Bhakdi, S., Muething, J. & Palmer, M.** (2000) Vibrio cholerae cytolysin: assembly and membrane insertion of the oligomeric pore are tightly linked and are not detectably restricted by membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* **1509**, 264-274.

**Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S. & Palmer, M.** (1999) Oligomerization of Vibrio cholerae cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem* **274**, 1375-1380.

**Zitzer, A., Palmer, M., Weller, U., Wassenaar, T., Biermann, C., Trantum-Jensen, J. & Bhakdi, S.** (1997) Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by Vibrio cholerae cytolysin (hemolysin). *Eur J Biochem* **247**, 209-216.

**Zitzer, A., Walev, I., Palmer, M. & Bhakdi, S.** (1995) Characterization of Vibrio cholerae El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Med Microbiol Immunol* **184**, 37-44.

**Zitzer, A.O., Nakisbekov, N.O., Li, A.V., Semiotrochev, V.L., Kiseliov Yu, L., Muratkhodjaev, J.N., Krasilnikov, O.V. & Ezepchuk Yu, V.** (1993) Entero-cytolysin (EC) from Vibrio cholerae non-O1 (some properties and pore-forming activity). *Zentralbl Bakteriol* **279**, 494-504.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BS <sup>3</sup>	bis[sulfosuccinimidyl]suberate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CDC	<i>cholesterol dependent cytolysin</i>
Ci	Curie
Diamid	diazenedicarboxylic acid bis(N,N'-dimethylamide)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DPM	Zerfall pro Minute; Radioaktivität (2220DPM = 1 nCi)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Hexa-Histidin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
JNK	<i>c-Junc N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MES	2-(N-Morholino)ethansulfonsäure
min	Minute
NEM	N-Ethylmaleimid
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NLRs	<i>nod-like receptors</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFO	Perfringolysin O
PFT	<i>pore-forming toxin</i>
PLY	Pneumolysin
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>



---

Pyren	N-(1-Pyrenyl)maleimid
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Sulphydryl-Gruppe
SLO	Streptolysin O
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
UV	Ultraviolett
v/v	Volume pro Volumen
VCC	<i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin
VFH	<i>Vibrio fluvialis</i> Hämolysin
VMH	<i>Vibrio mimicus</i> Hämolysin
VVH	<i>Vibrio vulnificus</i> Hämolysin
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wild-Typ
z.B.	zum Beispiel
$\beta$ -OG	$\beta$ -Octylglucosid

## 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mechanismus der Porenbildung für $\alpha$ -Toxin aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
Abbildung 2:	Schematische Darstellung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin.....	14
Abbildung 3:	Strukturen von $\beta$ -PFTs. ....	17
Abbildung 4:	Expressionsvektor pQE-30Vektor (Qiagen). ....	23
Abbildung 5:	Position der Mutationsstellen im VCC-Molekül. ....	41
Abbildung 6:	SDS-Page der gereinigten VCC-Derivate mit und ohne DTT. ....	42
Abbildung 7:	Vergleich der konzentrationsabhängigen hämolytischen Aktivität der Doppelcystein-Derivate mit und ohne DTT. ....	43
Abbildung 8:	Kinetik der hämolytischen Aktivität des Wt* und E322C/Q619C* mit und ohne DTT.....	44
Abbildung 9:	Charakterisierung des VCC-Derivates G327C/A601C*. ....	45
Abbildung 10:	Oligomerisierung von G327C/A601C* unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen. ....	47
Abbildung 11:	Co-Oligomerisierung des aktiven VCC-Derivats G325C* mit G327C/A601C*. ....	49
Abbildung 12:	Inhibierung von G325C* durch Zugabe von G327C/A601C*. ....	50
Abbildung 13:	Emissionsspektrum des Acrylodan-markierten G325C*-Toxins. ....	51
Abbildung 14:	Osmotischer Schutz von Kaninchen-Erythrozyten durch Maltotriose. ....	53
Abbildung 15:	Inhibierung der VCC-induzierten Hämolyse durch osmotisch wirksame Substanzen. ....	54
Abbildung 16:	Übersicht der einzelnen Domänen des VCC-Monomers. ....	55
Abbildung 17:	Schematische Darstellung der konstruierten VCC-Derivate. ....	56
Abbildung 18:	Spontane Spaltung von $\Delta\beta$ -Trefoil durch Erythrozyten- und Ghost-Proteasen.....	57
Abbildung 19:	Proteasestabilität der verkürzten VCC-Derivate im Vergleich zum Wild-Typ. ....	58
Abbildung 20:	Spaltung von TEV6 durch die TEV-Protease und konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität des Wild-Typs und TEV6 nach der Spaltung. ....	59
Abbildung 21:	Bindung von fluoreszenzmarkiertem Pro-VCC und VCC an Erythrozyten Ghosts. ....	60
Abbildung 22:	Konzentrationsabhängige hämolytische Aktivität von $\Delta\beta$ -Prism im Vergleich zum Wild-Typ. ....	62
Abbildung 23:	Spaltung des TEV1-Derivates durch die TEV-Protease und Bestimmung der hämolytischen Aktivität vor und nach der Spaltung. ....	63
Abbildung 24:	Hämolytische Aktivität von D642A/Y679A/Y704A und W387A/D642A/Y679A/Y704A. ....	64
Abbildung 25:	Bindung von $^3\text{H}$ -NEM-derivatisiertem ProVCC und VCC an Erythrozyten.....	66
Abbildung 26:	Postulierter Mechanismus der Porenbildung von <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin. ....	70
Abbildung 27:	Sequenzvergleich zwischen <i>Vibrio cholerae</i> Cytolysin (X51746) und <i>Vibrio fluvialis</i> Hämolysin (AF348455).....	73

### 8.3. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Radiochemikalien</i> .....	<i>21</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Antikörper</i> .....	<i>22</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Oligonukleotide</i> .....	<i>23</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Antibiotika und die verwendeten Konzentrationen</i> .....	<i>25</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Standardlösungen und Puffer</i> .....	<i>26</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>PCR-Ansätze</i> .....	<i>28</i>
<i>Tabelle 7:</i>	<i>PCR-Programm</i> .....	<i>28</i>
<i>Tabelle 8:</i>	<i>Zusammensetzung von SDS-Gelen</i> .....	<i>33</i>

## **9. Danksagung**

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.2006 bis 31.12.2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erstellt.