

**Einfluss glucosylierender Bakterientoxine auf die
intrazelluläre Lokalisation und Stabilität ihrer
Substrat-GTPasen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Birgit Hartmann
geboren am 13.01.1970 in Hannover

2005

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2001 bis Juni 2004 am Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ingo Just durchgeführt.

Referent: Prof. W. Müller

Koreferent: Prof. I. Just

Tag der Promotion: 31.05.05

Schlagworte: *Clostridium difficile*, Zytotoxin, RhoB
Clostridium difficile, Cytotoxin, RhoB

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ingo Just für die Ermöglichung der vorgelegten Dissertation, für seine fachliche Unterstützung im Verlauf der Untersuchungen und sein Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Referates und seine freundliche Unterstützung auf dem Weg zur Promotion.

Für die Betreuung und seinen Einsatz bei der Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Harald Genth bedanken.

Für das hervorragende Arbeitsklima, ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation bedanke ich mich ganz besonders bei Silke (Danke!!!) und Sandra sowie bei Anne, Tina, Karin, Gesa, den Dres. Ralf und Fred und natürlich bei den Schnecken-Ausdauerlutschern.

Vielen Dank an alle weiteren Mitarbeiter des Instituts für ihre freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Matthias für seine liebevolle Betreuung, Unterstützung, Motivation und seinen unerschütterlichen (?) Glauben in mich sowie meinen Eltern, bei denen ich immer willkommen bin.

Zusammenfassung

Clostridium difficile Toxin B (TcdB) glucosyliert und inaktiviert damit spezifisch die niedermolekularen GTPasen der Rho-Subfamilie Rho, Rac und Cdc42. Diese Glucosylierung führt zur Hemmung der Effektor-Kopplung und damit zur Blockade der nachgeschalteten Signaltransduktion. Zusätzlich kommt es zur Modulation der intrazellulären Lokalisation und zu einem Einfluss auf die Stabilität der modifizierten, inaktivierten Rho-GTPasen. Die vorliegende Arbeit beschreibt neue Details und zeigt ein komplexeres Bild der funktionellen Auswirkung der TcdB-vermittelten Glucosylierung auf die Rho-GTPasen.

Die Modulation der intrazellulären Lokalisation wurde näher untersucht. Es konnte dargestellt werden, dass die Glucosylierung von Rho, Rac und Cdc42 zu einer nukleotidunabhängigen Translokation der modifizierten GTPasen an die Membran führt. Für RhoA konnte gezeigt werden, dass es dadurch jedoch nicht zu einer veränderten Lokalisation der modifizierten GTPase innerhalb des Membrankompartimentes kommt. Die Membrandomäne, mit der das glucosylierte RhoA, wie auch das unmodifizierte RhoA assoziiert, wurde als die Membranmikrodomäne Caveolae identifiziert, die als putative Signalplattform für die Signaltransduktion diskutiert wird.

Im Hinblick auf die Stabilität der glucosylierten Rho-GTPasen konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von RhoB durch die TcdB-vermittelte Glucosylierung nicht beeinflusst wird. Die vielfach beschriebene vermeintliche Degradation von glucosyliertem Rac1 in der Western Blot-Analyse, ist auf seine fehlende Detektion durch den einzigen kommerziell erhältlichen monoklonalen Rac1-Antikörper zurückzuführen.

Dagegen konnte ein Effekt von TcdB auf die Stabilität der RhoB-mRNA nachgewiesen werden. TcdB induziert einen starken Anstieg der Proteinkonzentration von RhoB in kultivierten Zellen, der weder durch eine Stabilisierung des Proteins noch durch eine erhöhte Genexpression verursacht wird. Stattdessen kommt es unter dem Einfluss von TcdB zu einer Stabilisierung der RhoB-mRNA. Damit wird erstmals berichtet, dass TcdB nicht lediglich einen hemmenden Einfluss auf die unmittelbare Funktion der GTPasen infolge der Effektorbindungsblockade ausübt, sondern auch die Regulation der Proteinkonzentration eines seiner Substrate moduliert.

Abstract

The family of Rho proteins (Rho, Rac, Cdc42) belongs to the Ras superfamily of low molecular mass GTPases. Rho, Rac and Cdc42 are mono-glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) resulting in inactivation of the GTPases. Glucosylation inhibits downstream signalling by blocking effector coupling. Furthermore it induces the modulation of the intracellular localisation of modified Rho, Rac and Cdc42 and takes influence on their intracellular stability.

The present study offers new insights into the mode of modulation of the intracellular localisation and the intracellular stability of glucosylated Rho proteins.

Glucosylation of Rho, Rac and Cdc42 induced a nucleotide-independent translocation of the modified GTPases to the membrane. The membrane domain which bound glucosylated as well as unmodified RhoA was identified as caveolae. The caveolae membrane domain is discussed as a putative signalling domain in signaltransduction pathways.

In respect to the stability of glucosylated Rho proteins, the present study shows that TcdB-dependent glucosylation did not influence the stability of modified RhoB. The putative degradation of glucosylated Rac1 described by different authors turned out to be based on an impaired Rac1-recognition by the only commercially available monoclonal Rac1-antibody.

Interestingly the application of TcdB on cultivated cells induced an increase of the intracellular RhoB protein level which was due to a stabilisation of the RhoB-mRNA. This is the first report on an effect of TcdB that leads to an upregulation of its own substrate GTPase.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Niedermolekulare Rho-GTPasen | 1 |
| 1.1.1 | Funktionen der Rho-Proteine | 2 |
| 1.1.2 | Strukturelemente der Rho-Proteine | 3 |
| 1.1.3 | Regulation der Rho-Proteine | 4 |
| 1.1.3.1 | GTPase-Zyklus und subzelluläre Lokalisation der Rho-Proteine | 4 |
| 1.1.3.2 | Genexpression und Stabilität der Genprodukte | 6 |
| 1.1.3.3 | Die Ausnahmestellung der Rho-GTPase RhoB | 7 |
| 1.1.4 | Caveolae und niedermolekulare Rho-GTPasen | 7 |
| 1.2 | Rho-Proteine und große clostridiale Zytotoxine | 9 |
| 1.2.1 | <i>Clostridium difficile</i> Toxine A und B (TcdA und TcdB) | 10 |
| 1.2.1.1 | Zytotoxische Effekte von TcdA und TcdB | 12 |
| 1.2.1.2 | Modifikation von Rho-Proteinen durch TcdB | 12 |
| 1.2.2 | Einfluss der Modifikation von Rho-Proteinen durch TcdB | 14 |
| 1.2.2.1 | Intrazelluläre Lokalisation glucosylierter Rho-Proteine | 14 |
| 1.2.2.2 | Stabilität glucosylierter Rho-Proteine | 15 |
| 2 | Zielsetzung | 17 |
| 3 | Material | 19 |
| 3.1 | Zelllinien und Medien | 19 |
| 3.1.2 | Originär gereinigte Toxine | 19 |
| 3.2 | Kits und Substanzen für DNA- und RNA-Arbeiten | 19 |
| 3.3 | Primer | 20 |
| 3.4 | Plasmide | 20 |
| 3.5 | Antikörper | 20 |
| 3.6 | Geräte | 21 |
| 3.7 | Verbrauchsmaterial | 22 |
| 3.8 | Chemikalien und sonstige Materialien | 22 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.9 | Lösungen | 24 |
| 4 | Methoden | 27 |
| 4.1 | Zellbiologische Methoden | 27 |
| 4.1.1 | Kulturbedingungen | 27 |
| 4.1.2 | Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten | 27 |
| 4.1.3 | Zytotoxizitätsassay | 28 |
| 4.1.4 | Hemmung der Proteindegradation durch den Proteasomen- Hemmers Lactacystin | 28 |
| 4.1.5 | Hemmung der Transkription durch den Inhibitor der DNA- abhängigen RNA-Polymerase Actinomycin D | 29 |
| 4.1.6 | Hemmung der Proteinsynthese durch den Proteinbiosynthese- Hemmer Cycloheximid | 29 |
| 4.1.7 | Rhodamin-Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts | 29 |
| 4.2 | Proteinbiochemische Methoden | 30 |
| 4.2.1 | Gewinnung von Zelllysat | 30 |
| 4.2.2 | Expression und Fällung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> | 30 |
| 4.2.3 | Mobilisierung der GST-Fusionsproteine durch Elution mit Glutathion | 31 |
| 4.2.4 | Mobilisierung der Rho-GTPasen mittels Thrombinverdau | 31 |
| 4.2.5 | Glucosylierung von Rho-GTPasen | 32 |
| 4.2.5.1 | Radioaktive Glucosylierung von Rho-Proteinen im Lysat | 32 |
| 4.2.5.2 | Radioaktive Glucosylierung von rekombinanten Rho-Proteinen im Puffersystem | 32 |
| 4.2.6 | Isolierung von Zellkompartimenten | 32 |
| 4.2.6.1 | Zytosol-Membran-Trennung mittels Ultrazentrifugation | 32 |
| 4.2.6.2 | Sucrose-Dichtezentrifugation | 32 |
| 4.2.7 | Zytosol-Membran-Translokation von Rho-Proteinen | 34 |
| 4.2.8 | Extraktion von RhoB aus Membranen | 34 |
| 4.2.9 | Protein-Analyse | 35 |
| 4.2.9.1 | Direkte Zellyse | 35 |
| 4.2.9.2 | Protein-Bestimmung nach Bradford | 35 |
| 4.2.9.3 | Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.9.4 | Proteinfärbung im Gel | 36 |
| 4.2.9.5 | Nasszellen-Westernblot | 36 |
| 4.2.9.6 | Immunodetektion | 37 |
| 4.2.9.7 | Strippen von Membranen | 38 |
| 4.3 | Molekularbiologische Methoden | 38 |
| 4.3.1 | Aufreinigung von pEGFP-C1-RhoA- und pEGFP-C1-Rac1- Plasmid-DNA | 38 |
| 4.3.1.1 | Bestimmung der DNA-Konzentration | 39 |
| 4.3.2 | mRNA-Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR | 39 |
| 4.3.2.1 | Isolierung von Gesamt-RNA | 40 |
| 4.3.2.2 | Bestimmung der RNA-Konzentration | 40 |
| 4.3.2.3 | Reverse-Transkription (RT) | 41 |
| 4.3.2.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 42 |
| 4.3.2.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 43 |
| 4.3.3 | Polymerase-Kettenreaktion für Sequenzierung | 44 |
| 5 | Ergebnisse | 46 |
| 5.1 | Nachweis der Substratspezifität und Dokumentation der zytotoxischen Wirkung von TcdB | 46 |
| 5.1.1 | RhoA, Rac1 und Cdc42 sind spezifische Substrate von TcdB | 46 |
| 5.1.2 | Zytotoxische Wirkung von TcdB auf NIH3T3-Zellen | 46 |
| 5.2 | Einfluss von TcdB auf die Proteinkonzentration von Rac1 | 48 |
| 5.2.1 | <i>In vitro</i> -Nachweis von glucosyliertem RhoA und Rac1 | 49 |
| 5.2.2 | <i>In vivo</i> -Nachweis von glucosyliertem RhoA und Rac1 | 53 |
| 5.3 | Einfluss von TcdB auf die RhoB-GTPase RhoB | 55 |
| 5.3.1 | TcdB-vermittelte Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der RhoB-Proteinzunahme | 56 |
| 5.3.2 | Wirkung von TcdB auf die Stabilität von glucosyliertem RhoB | 59 |
| 5.3.3 | Wirkung von TcdB auf den RhoB-mRNA-Gehalt der Zelle | 60 |
| 5.4 | Lokalisation von unmodifizierten und glucosylierten Rho- Proteinen in der Zelle | 64 |
| 5.4.1 | Die Zytosol-Membran-Verteilung der Rho-Proteine | 64 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.4.2 | Die Lokalisation von Rho-Proteinen in der Membrandomäne Caveolae | 65 |
| 5.4.2.1 | Der Einfluss der Glucosylierung auf die Verteilung von RhoA innerhalb des Membrankompartiments | 67 |
| 6 | Diskussion | 69 |
| 6.1 | Einfluss von TcdB auf die Stabilität des Rac1-Proteins | 69 |
| 6.2 | Einfluss von TcdB auf das RhoB-Protein | 72 |
| 6.3 | Einfluss von TcdB auf die Lokalisation von Rho-Proteinen | 74 |
| 6.4 | Ausblick | 76 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 79 |
| 8 | Veröffentlichungen | 91 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| bp | Basenpaar |
| C3 | C3-Transferase (ADP-Ribosyltransferase von <i>Clostridium botulinum</i>) |
| CAAX-Box | Cystein-zwei aliphatische Aminosäuren-Methionin, Serin oder Leucin |
| CNF-1 | <i>Escherichia coli</i> cytotoxic necrotizing factor-1 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNT | <i>Bordetella bronchioseptica</i> dermonecrotizing toxin |
| DXD | Aspartat-beliebige Aminosäure-Aspartat |
| EGF | Epidermal growth factor |
| F-Aktin | Filamentöses Aktin (Polymer) |
| G-Aktin | Globuläres Aktin (Monomer) |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GCZ | Große clostridiale Zytotoxine |
| GDI | Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor |
| GDP | Guanosin-5'-diphosphat |
| GEF | Guaninnukleotid-Austauschfaktor |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| HRP | Merrettich-Peroxidase |
| kDa | kilo-Dalton |
| LPA | Lysophosphatidic Acid |
| mRNA | Messenger RNA |
| mAb | Monoklonaler Antikörper |

| | |
|----------------------|---|
| dNTP | Desoxynucleotid-Triphosphat |
| pAb | Polyklonaler Antikörper |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF | Platelet derived growth factor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| TcdA | <i>Clostridium difficile</i> Toxin A |
| TcdB | <i>Clostridium difficile</i> Toxin B ₁₀₄₆₃ , des <i>C. difficile</i> Stammes |
| VPI 10463 | |
| TcdB546 | <i>Clostridium difficile</i> Toxin B, katalytische Domäne |
| TcdB ₁₄₇₀ | <i>Clostridium difficile</i> Toxin B, des <i>C. difficile</i> Stammes 1470 |
| TcsL | <i>Clostridium sordellii</i> letales Toxin |
| Thr | Threonin |
| tRNA | “transfer“- Ribonukleinsäure |
| UDP | Uridin-5'-diphosphat |

1 Einleitung

1.1 Niedermolekulare Rho-GTPasen

GTPasen sind elementare Moleküle in der Signaltransduktion. Man unterscheidet die heterotrimeren und die niedermolekularen, monomeren GTP-bindenden Proteine. Beide Klassen fungieren als molekulare Schalter, die einen aktiven GTP-gebundenen und einen inaktiven GDP-gebundenen Zustand einnehmen können. Im aktiven Zustand sind sie zentral in die Signaltransduktion der eukaryonten Zellen eingeschaltet. Die niedermolekularen GTPasen werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF, LPA, und PDGF aktiviert (Kozma et al. 1995; Pelletier et al. 2003; Ridley et al. 1992a/b).

Zu den niedermolekularen GTPasen gehören die Rho-GTPasen. Sie gehören zur Ras-Superfamilie, der monomeren 20 – 30 kDa kleinen GTP-bindenden Proteine, zu der mit über 100 Vertretern außerdem die Ras-, Rab-, Arf- und Ran-Familie gehören. Die Rho-Familie setzt sich aus 22 Mitgliedern zusammen, die wiederum in 8 Subfamilien eingeteilt werden können (Aspenström et al. 2004):

Tabelle 1: Untergliederung der Rho-Unterfamilie niedermolekularer GTPasen

| Subfamilie | Mitglieder |
|------------|-------------------------------|
| Cdc42 | Cdc42, TC10, TCL, Wrch-1, Chp |
| Rac | Rac1 - 3, RhoG |
| Rho | RhoA - C |
| RhoH | RhoH |
| RhoBTB | RhoBTB1 - 2 |
| RhoD | RhoD, Rif |
| Rnd | Rnd1 - 3 |
| Miro | Miro1 - 2 |

Von den Mitgliedern der Rho-Unterfamilie sind die Rho-, Rac- und Cdc42-Subfamilien bisher am besten charakterisiert. Für diese (im weiteren Rho-Proteine genannt) sind bislang über 60 Effektorproteine bekannt, dazu über 60 positive Regulatoren (GEFs), über 70 negative Regulatoren (GAPs) sowie 3 Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) (Etienne-Manneville et al. 2002). Im Gegensatz dazu gibt es derzeit im Hinblick auf die anderen Subfamilien der Rho-Unterfamilie nur wenige Daten über ihre Funktion und Regulation.

1.1.1 Funktionen der Rho-Proteine

Rho-Proteine übernehmen in der Zelle viele unterschiedliche Aufgaben. So sind sie u.a. in die Regulation des Zellzyklus, die Gentranskription, die unspezifische Immunabwehr, in die Regulation der Apoptose und auch in die Ras-induzierte Zelltransformation eingeschaltet (Chuang et al. 1997; Etienne-Manneville et al. 2002; Fritz et al. 2000, 2002; Prendergast et al. 1995).

Die bedeutendste Funktion der Rho-Proteine besteht jedoch in der Regulation des Aktinzytoskeletts. Dort spielen sie bei der Bildung von Zell-Zellkontakten (Braga et al. 1997), der Zelladhäsion (Clark et al. 1998), bei der Endo- und Exozytose (Ridley et al. 2001) und insbesondere bei der Ausbildung der Zellmorphologie, -polarität und der Zellmotilität (Etienne-Manneville et al. 2002; Schmitz et al. 2000) eine zentrale Rolle. Bei der selektiven Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 kommt es zu jeweils charakteristischen Ausprägungen der Zellmorphologie. Die Aktivierung von RhoA hat die Ausbildung von Aktinkabeln und Adhäsionspunkten zur Folge, während es nach Aktivierung von Rac1 bzw. Cdc42 zur Lamellipodienbildung bzw. zur Filopodienbildung kommt (Nobes et al. 1995) [**Abb. 1**].

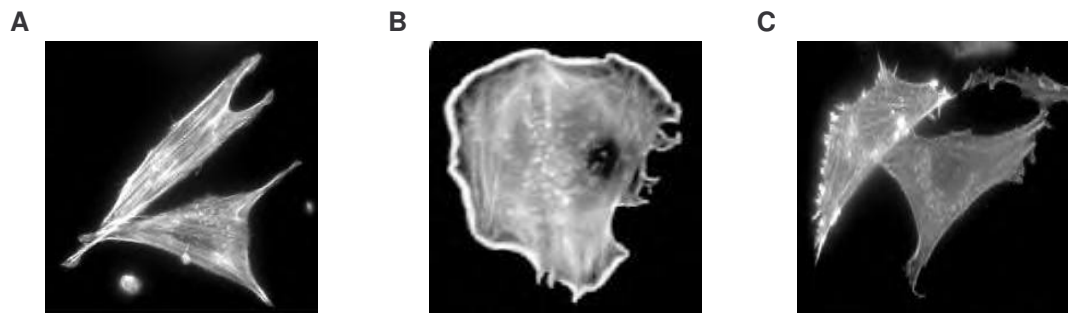


Abb. 1: Charakteristische Auswirkungen der aktivierten Rho-Proteine auf das Aktinzytoskelett. Nach der selektiven Aktivierung von RhoA kommt es zur Ausbildung von Aktinkabeln und Adhäsionspunkten [A]. Die selektive Aktivierung von Rac1 führt zur Bildung von Lamellipodien [B], während die selektive Aktivierung von Cdc42 die Bildung von Filopodien zur Folge hat [C].

1.1.2 Strukturelemente der Rho-Proteine

Für die Funktion der Rho-GTPasen sind bestimmte Tertiärstrukturen von besonderer Bedeutung. Dazu gehören eine α -helikale Domäne (Insert-Helix), eine β -Faltblatt-Struktur sowie zwei Schleifen, auch Schalterregion-1 und -2 genannt.

Die beiden Schalterregionen sind für den GDP-GTP-Nukleotidaustausch und die Effektorbindung von Bedeutung. Dabei kommt es nach der Hydrolyse des GTP zu GDP zu einer Konformationsänderung in der Schalterregion-1, die der GTP-gebundenen GTPase erlaubt, mit ihrem Effektorprotein zu interagieren. Es kommt außerdem zur Verlagerung der in der GTP-gebundenen Form im Inneren des Moleküls gelegenen Hydroxylgruppe des Thr-37 (RhoA) bzw. des Thr-35 (Rac1, Cdc42) an die Moleküloberfläche. Diese Hydroxylgruppen koordinieren in der GTP-gebundenen Form das γ -Phosphat sowie ein Magnesiumatom, welches essentiell für die starke Affinität der Nukleotide zu den Rho-GTPasen und die GTPase-Aktivität an sich ist (Dvorsky et al. 2004; Hirshberg et al. 1997; Ihara et al. 1998; Pan et al. 1998; Wei et al. 1997).

Eine weitere wichtige Domäne stellt die C-terminale CAAX-Box der Rho-GTPasen dar. Für die Funktion der GTPasen ist die Assoziation mit der Membran notwendig. Um diese zu gewährleisten, werden die Rho-GTPasen posttranslational modifiziert (Fang et al. 1996). Dabei wird den Rho-Proteinen

ein Geranylgeranylrest auf das Cystein der CAAX-Box übertragen. RhoB kann auch palmitoyliert bzw. farnesyliert werden (Adamson et al. 1992a; Kinsella et al. 1991). Zusätzlich zu den Isoprenresten ist für die Membranbindung der Rho-GTPasen eine N-terminal der CAAX-Box gelegene polybasische Domäne verantwortlich (Del Pozo et al. 2002).

An der Bindung von positiven und negativen Regulatorproteinen (GEFs/GDIs) ist neben den Schalterregionen-1 und -2 eine C-terminale β -Faltblatt-Struktur beteiligt (Gosser et al. 1997; Keep et al. 1997; Scheffzek et al. 2000; Sprang et al. 1998).

1.1.3 Regulation der Rho-Proteine

Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben werden die Rho-Proteine strikt reguliert. Die Regulation erfolgt über folgende Mechanismen:

- GTPase-Zyklus
- Subzelluläre Lokalisation
- Genexpression und Stabilität des Genprodukts

1.1.3.1 GTPase-Zyklus und subzelluläre Lokalisation der Rho-Proteine

Rho-Proteine hydrolysieren im Vergleich zu der enzymatischen Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine GTP etwa 100-fach langsamer. Zumal GTP im Zytosol in etwa 10-fach höherer Konzentration vorliegt als GDP, benötigen die Rho-Proteine zusätzlich GTPase-aktivierende Proteine (GAPs). Diesen negativen Regulatoren wirken wiederum Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) entgegen, die den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP aus dem Zytosol fördern. Infolge der Vielzahl dieser sehr spezifischen Interaktionen können die Rho-Proteine sehr genau reguliert werden. Die Regulation geschieht weiterhin über einen Zytosol-Membran-Zyklus. In diesem Zusammenhang spielen Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) und GEFs eine zentrale Rolle (Symons et al. 2000) [**Abb. 2**].

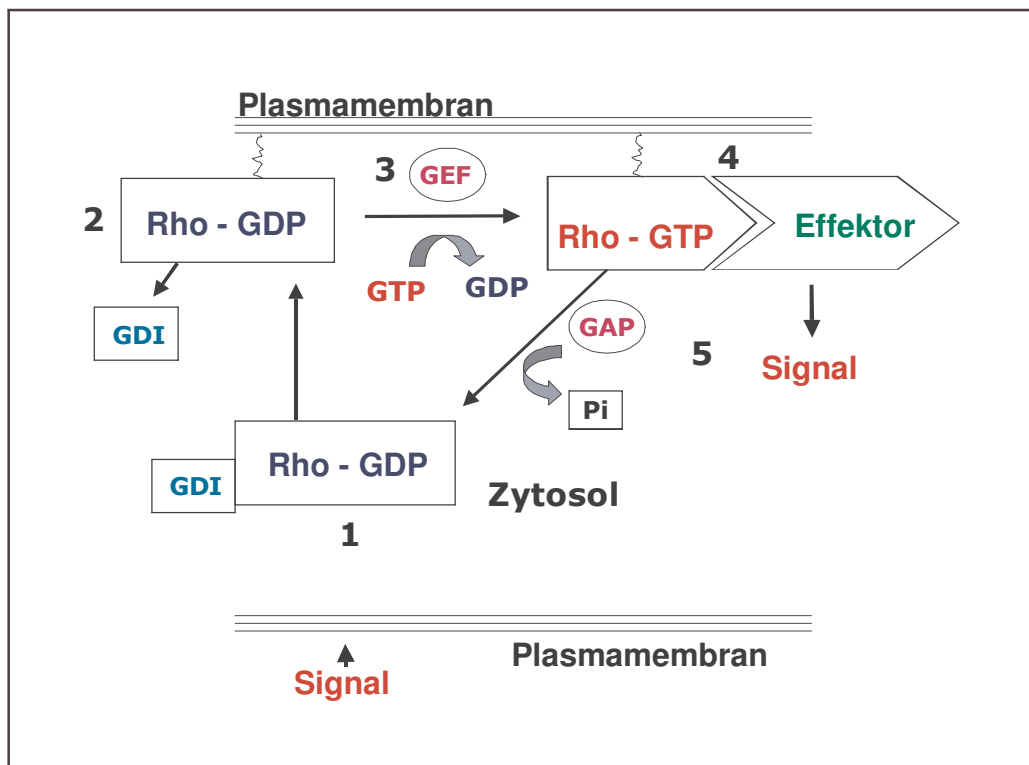


Abb. 2: Regulationszyklus der niedermolekularen Rho-Proteine. Inaktive, GDP-gebundene Rho-Proteine liegen im Zytosol an Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) gebunden vor. Ihre Bindung an GDI verhindert den spontanen Nukleotidaustausch [1]. Signalvermittelt translozieren die GTPasen an die Plasmamembran, wo der GTPase-GDI-Komplex aktiv gespalten wird [2]. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) fördern den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP [3]. Durch eine Konformationsänderung bedingt können GTP-gebundene Rho-Proteine mit ihren Effektorproteinen interagieren und die entsprechenden Signale weitergeben [4]. Die Signalweitergabe wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) limitiert. Sie fördern die intrinsische GTPase-Reaktion der Rho-Proteine [5]. Die GDP-gebundenen Rho-Proteine werden von GDIs aus der Plasmamembran gelöst und im Komplex erneut im Zytosol sequestriert [1].

In inaktivem Zustand sind die Rho-Proteine hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Sie liegen dort in GDP-gebundenem Zustand im Komplex mit spezifischen GDIs vor (Adamson et al. 1992; Hoffman et al. 2000). Die GDIs sequestrieren die GDP-gebundenen Rho-GTPasen im Zytosol durch Maskierung ihrer Lipidanker und der polybasischen Domäne sowie mittels Protein-Protein-Interaktion und inhibieren den spontanen GDP-GTP-Austausch (Del Pozo et al. 2002; Faure et al. 2001; Gosser et al. 1997; Lian et al. 2000). Der GTPase-GDI-

Komplex ist hochaffin. Für die Aktivierung und Funktion der Rho-Proteine ist eine Translokation an die Membran nötig, wo die Spaltung des GTPase-GDI-Komplexes durch an der Plasmamembran lokalisierte Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-Proteine vermittelt wird (Bretscher et al. 2002; Takahashi et al. 1997). Zuvor ist die Aktivierung der ERM-Proteine selbst notwendig, an der u.a. auch die Rho-Proteine beteiligt sind (Barret et al. 2000; Hirao et al. 1996). Die freigesetzten GDP-gebundenen Rho-Proteine sind in der Lage, mittels ihres Isoprenrestes und der polybasischen Domäne, mit der Membran zu assoziieren. Membrangebunden können die GTPasen durch eine ganze Reihe von spezifischen, ebenfalls membrangebunden GEFs aktiviert werden, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Die GTP-gebundenen Rho-Proteine können ihrerseits mit spezifischen Effektorproteinen interagieren (Hoffman et al. 2002; Zhou et al. 1998). Eine Übersicht über die Vielzahl der Effektorproteine und ihrer Funktionen geben Bishop and Hall (2000).

GEFs katalysieren nicht nur den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP, sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Translokation von ERM-Proteinen an die Membran (Vanni et al. 2004). Damit sind sie in der Lage, eine entsprechende Plattform zu generieren, an der die GTPase-GDI-Komplexe gespalten werden und sie die freigesetzten Rho-Proteine direkt aktivieren können.

Die Inaktivierung der Rho-Proteine wird schließlich von den GAPs katalysiert. Sie erhöhen die äußerst langsame intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine und fördern somit ihre GDP-Beladung (Moon et al. 2003). In GDP-gebundenem Zustand werden die GTPasen im letzten Schritt des Zyklus von GDIs aus der Membran herausgelöst. Dabei interagieren die Rho-Proteine verstärkt mit GDI-Proteinen, wenn sie phosphoryliert vorliegen (Forget et al. 2002; Gosser et al. 1997). Die Rho-GTPasen translozieren im GDI-Komplex erneut ins Zytosol der Zelle und verbleiben dort in ihrem inaktiven Zustand.

1.1.3.2 Genexpression und Stabilität der Genprodukte

Neben ihrer Regulation durch die Nukleotid-Bindung und subzelluläre Verteilung werden die Rho-Proteine auch indirekt über ihre Genexpression und ihre Stabilität reguliert. RhoA, Rac1 und Cdc42 stellen stabile Proteine dar

(Wennerberg et al. 2004). Für RhoA bzw. Cdc42 wurden Halbwertszeiten von 31 bzw. 15 h ermittelt (Backlund et al. 1997).

1.1.3.3 Die Ausnahmestellung der Rho-GTPase RhoB

Im Hinblick auf die Proteine der Rho-Subfamilie nimmt RhoB eine Ausnahmestellung ein. Im Gegensatz zu RhoA und RhoC unterliegt es nicht dem Zytosol-Membran-Zyklus, sondern liegt an der Plasmamembran gebunden sowie mit frühen Endosomen und Prälysosomen assoziiert vor (Adamson et al. 1992). Dort interagiert es mit einem membran-gebundenen GDI-Protein (GDI-3) (Zalcman et al. 1996). RhoB wird zusätzlich über die Art seines Isoprenrestes reguliert. So führen seine unterschiedlichen Isoprenylierungsformen zu unterschiedlichen Funktionen in der Zelle (Lebowitz et al. 1997). RhoB ist mit einer Halbwertszeit von ca. 2 – 3 h ein sehr kurzlebige Protein (Lebowitz et al. 1995). Auch seine mRNA hat im Gegensatz zur mRNA von RhoA, aber auch zu den entsprechenden mRNAs von Rac1 und Cdc42, eine kurze Halbwertszeit von 1 h (Wennerberg et al. 2004; Westmark et al. 2004). *rhoB* ist ein immediate-early-gene und wird in den meisten Zellen konstitutiv sehr schwach exprimiert. Eine verstärkte Genexpression wurde nach genotoxischem Stress wie UV-Bestrahlung oder nach Behandlung von Zellen mit Alkylantien beobachtet (Fritz et al. 1995; Malcom et al. 2003).

RhoB ist in die Zelltransformation, die Apoptose sowie in die Regulation der Endozytose eingeschaltet. Seine Rolle an der Regulation des Aktinzytoskellets ist dagegen unklar (Fritz et al. 2000; Jiang et al. 2004; Rojas et al. 2000).

1.1.4 Caveolae und niedermolekulare Rho-GTPasen

Die komplexe Regulation der Rho-Proteine erfordert eine strikte Koordination der beteiligten Proteine, wie Regulator-, Effektor- und Adapterproteine, die ebenfalls die korrekte Lokalisation der GTPasen einschließt. Diese Koordination stellt die Voraussetzung für die Rho-abhängige Signalübertragung dar. In den letzten Jahren hat das Modell von Mikrodomänen als Signalplattformen innerhalb der Membran allgemeine Zustimmung gewonnen. Im Zentrum dieser Forschung steht die sogenannte Caveolae-Domäne. Die Caveolae-Domäne ist

eine besondere Form der Lipid rafts. Als „Lipid rafts“ werden Membranregionen bezeichnet, die reich an Glycosphingolipiden und Cholesterol sind, wodurch diese Membranabschnitte geordneter und weniger flüssig vorliegen als die sie umgebende Membran. Dabei werden verschiedene Formen der Lipid rafts unterschieden. Neben den einfachen Lipid rafts gibt es jene, in denen ein bestimmtes Strukturprotein angereichert ist. Infolge dessen kommt es zu einer Veränderung der Morphologie und/oder einer Veränderung der Funktion dieser Membrandomänen (Galbiati et al. 2001). Die Caveolae-Domäne wurde ursprünglich als flaschenartige Membraneinstülpung beschrieben (Yamada et al. 1955). Durch die nähere Untersuchung der Domäne konnte ein Markerprotein, das Caveolin, identifiziert werden (Rothberg et al. 1992). Aufgrund des hohen Gehaltes an Glycosphingolipiden und Cholesterol weist dieser Membranabschnitt eine geringe Dichte auf, wodurch es möglich ist, die Caveolae-Domäne über eine Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren. Die Anreicherung des Markerproteins Caveolin ist als Marker der Caveolae-Domäne akzeptiert (Richard et al. 1998).

Die Analyse dieses Membrankompartimentes zeigte die Kollokalisierung von Caveolin mit einer Anzahl von Signalmolekülen. Es konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene niedermolekulare GTPasen mit Caveolin kollokalisiert sind. So konnte für H-Ras, RhoA, Cdc42, Rac1 als auch TC10 eine Kollokalisierung mit Caveolin beobachtet werden (de Weerd et al. 1997; Gingras et al. 1998; Michaely et al. 1999; Prior et al. 2001a/b; Song et al. 1996), wobei für RhoA eine direkte Bindung mit der Isoform Caveolin-1 gezeigt ist (Gingras et al. 1998; Michaely et al. 1999).

Für RhoA als auch für Rac1 und TC10 konnte gezeigt werden, dass sie nur in der Caveolae-Mikrodomäne lokalisiert aktiviert werden können (Kawamura et al. 2003; Watson et al. 2001). Del Pozo et al. (2004) wiesen dabei nach, dass GTP-gebundenes Rac1 selektiv mit Caveolae-Domänen assoziiert vorliegt. Diese Lokalisation und auch seine Fähigkeit, Effektorproteine zu aktivieren, geschah Integrin-vermittelt und hing zu einem Teil von der Lipidzusammensetzung der Membran ab. Bei Verlust der Membranimikrodomäne, z.B. durch Internalisation, verliert Rac1 die Fähigkeit, seine

Effektorproteine zu aktivieren. Es ist durchaus möglich, dass die Caveolae-Domäne als Signalplattform für die notwendige Koordination der Rho-Proteine und ihrer Interaktionspartner dient und an der Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist. Dafür spricht ebenfalls, dass in der Caveolae-Domäne sowohl das Rho-GAP p122 als auch Rezeptoren für den Cdc42-Aktivator Bradykinin nachgewiesen werden konnten. Es wurde außerdem beobachtet, dass die Lipopolysaccharid-induzierte Aktivierung von Cdc42 mit einer Translokation von Cdc42 in Membranmikrodomänen einher geht (Fessler et al. 2004; Yamaga et al. 2004). Es gibt zudem weitere Befunde, die eine Assoziation von Caveolin mit F-Aktin, die Bindung von Filamin an Caveolin-1 und eine Kollokalisierung von Caveolin-1 positiver Strukturen mit RhoA-induzierten Aktinkabeln zeigen (Kanzaki et al. 2002; Stahlhut et al. 2000).

1.2 Rho-Proteine und große clostridiale Zytotoxine

Die Tatsache, dass die niedermolekularen GTP-bindenden Proteine zentrale Signalmoleküle darstellen, die zudem in die Immunabwehr involviert sind, macht sie zum Angriffspunkt zahlreicher bakterieller Toxine. Bisher sind über 30 bakterielle Toxine und Virulenzfaktoren identifiziert worden, die allein mit den Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 über eine direkte oder indirekte Interaktion interferieren (Barbieri et al. 2002; Boquet et al. 2003). Zu den Toxinen, die direkt mit Rho, Rac und Cdc42 interagieren gehören die großen clostridialen Zytotoxine (GCZ).

Die Gattung *Clostridium* gehört zur Familie der *Bacillaceae* und fasst alle stäbchenförmigen, anaeroben, grampositiven Keime zusammen, die die Fähigkeit zur Sporenbildung besitzen. *Clostridien* sind ubiquitär verbreitet und kommen sowohl im Erdboden, in Abwässern als auch in der natürlichen Darmflora des Gastrointestinaltrakts von Säugern vor. Aufgrund ihrer Fähigkeit zahlreiche histolytische-, Entero- und Neurotoxine zu produzieren, gelten viele Vertreter als bedeutende Humanpathogene. Darunter befinden sich *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. sordellii* und *C. novyi*. *C. difficile*, *C. sordellii* und *C. novyi* produzieren strukturell und funktionell ähnliche Toxine, die als Familie

der GCZ zusammengefasst werden. Ihre Mitglieder gehören zu den größten bekannten bakteriellen Toxinen (Just et al. 2004).

C. difficile wurde erstmals 1935 von Hall und O'Toole beschrieben. Es ist einer der häufigsten Erreger von nosokomial erworbenen enteritischen Infektionen. Die von ihm gebildeten Exotoxine Toxin A und Toxin B sind die Hauptpathogenitätsfaktoren der pseudomembranösen Colitis und der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe und somit von großer klinischer Bedeutung (Pothoulakis et al. 2001). Sie sind daher unter den GCZ am besten untersucht. Aufgrund ihrer Substratspezifität werden sie auch als biochemische Werkzeuge zur Aufklärung der Signalwege niedermolekularer GTPasen der Rho-Familie genutzt (Schiavo et al. 2001).

1.2.1 *Clostridium difficile* Toxine A und B (TcdA und TcdB)

TcdA und TcdB besitzen eine Molekularmasse von 308 bzw. 270 kDa und sind chromosomal kodiert (Barroso et al. 1990; Dove et al. 1990). Die Toxine sind einkettige Polypeptide, die aus drei funktionellen Domänen bestehen: die Rezeptor-Bindedomäne, die Transmembran-Domäne sowie die katalytische Domäne [Abb. 3]. Die Rezeptor-Bindedomäne ist charakterisiert durch repetitive Peptidelemente, die sogenannten CROPs (Combined repetitive oligopeptides). Mit dieser Domäne binden die Toxine an die noch unbekannt Rezeptoren an der Zelloberfläche der eukaryonten Zellen. Die Aufnahme der Toxine erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Henriques et al. 1987). Eine N-terminal der Rezeptor-Bindedomäne gelegene hydrophobe Region, die Transmembran-Domäne, ermöglicht die Translokation der katalytischen Domäne aus dem sauren Endosom in das Zytoplasma. Für TcdB konnte gezeigt werden, dass die Transmembran-Domäne an der Porenbildung beteiligt ist, durch die die katalytische Domäne in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt wird. Die katalytische Domäne wird zuvor an der Aminosäure 543 proteolytisch vom Holotoxin abgespalten (Barth et al. 2001; Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005). Die N-terminal gelegene katalytische Domäne besitzt Glucosyltransferase-Aktivität. Wichtige Aminosäuren innerhalb der katalytischen

Domäne sind Tryptophan-102 sowie die Aspartate-286 und-288 in TcdB, die das DXD-Motiv (Aminosäuren 286-288) bilden und über die Koordination eines Mn(II) die Bindung des Kosubstrates UDP-Glucose am katalytischen Zentrum vermitteln. Dieses Motiv ist unter den clostridialen Toxinen hoch konserviert und findet sich ebenfalls in diversen anderen pro- und eukaryotischen Glucosyltransferasen (Busch et al. 1998, 2000). C-terminal davon sind die Sequenzen angeordnet, die für die spezifische Proteinsubstraterkennung der Toxine verantwortlich sind (Hofmann et al. 1998). Die minimale Größe der funktionellen katalytischen Domäne besteht aus den Aminosäureresten 1–546 im Falle des TcdB (Hofman et al. 1997; Rupnik et al. 2005) und den Aminosäureresten 1–659 für Toxin A (Faust et al. 1998).

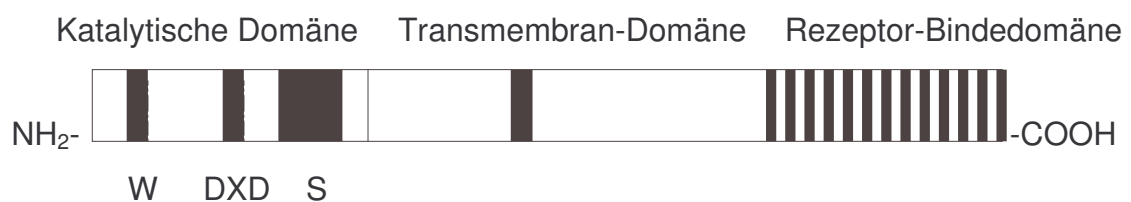


Abb. 3: Drei-Domänen-Modell von *C. difficile* TcdA und TcdB. Die Toxine werden in drei Domänen unterteilt. C-terminal befindet sich die Rezeptor-Bindedomäne, die durch repetitive Oligopeptide gekennzeichnet ist und die Bindung an noch unbekannte Rezeptorstrukturen vermittelt. N-terminal davon befindet sich eine hydrophobe Region, die Transmembran-Domäne, die für die Translokation der katalytischen Domäne ins Zytosol verantwortlich ist. Die katalytische Domäne ist am N-Terminus der Toxine lokalisiert. Sie besitzt Mono-Glucosyltransferaseaktivität. Ein C-terminaler Bereich der Domäne (S) ist für die Substraterkennung verantwortlich, während das DXD-Motiv zusammen mit dem Tryptophan-102 (W) über die Koordination eines Mn(II) die Bindung des Kosubstrates UDP-Glucose vermittelt.

1.2.1.1 Zytotoxische Effekte von TcdA und TcdB

Im Tiermodell wurden je nach Applikationsform verschiedene Effekte der Toxine beschrieben. In Nagern wirken sie bei parenteraler Applikation nach Steigerung der vaskulären Permeabilität letal (Lyerly et al. 1982). Die Instillation von TcdA ins Darmlumen führt zu schwerer Hämorrhagie, Mukosaödem, Durchfällen und Tod, wobei die des TcdB nur örtlich begrenzte Hämorrhagien auslöst und nicht letal wirkt. Aufgrund dieser Befunde wurde TcdA als Enterotoxin klassifiziert (Lima et al. 1988; Taylor et al. 1981). In kultivierten Zellen bewirken beide Toxine nach extra- und intrazellulärer Applikation die gleiche charakteristische Veränderung der Zellmorphologie. Es kommt zur Retraktion des Zellkörpers, wobei filamentöse Ausläufer vorerst erhalten bleiben. Im weiteren Verlauf der Vergiftung kommt es zur vollständigen Abrundung der Zellen mit Auflösung der Retraktionsfasern und zur Ablösung der Zellen von der Matrix. Dabei entfaltet TcdB eine 100-1000fach stärkere zytotoxische Wirkung als TcdA und wird daher auch als „Zytotoxin“ bezeichnet (Chaves-Olarte et al. 1997; Rothman et al. 1984).

Die Veränderungen der Zellmorphologie sind die Folge einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, welches den Stützapparat der Zelle darstellt. Es kommt zu einer Disaggregation der die Zelle durchspannenden Aktinkabel. Nach Behandlung von Zellen mit TcdB kann zudem eine Verlagerung von F-Aktin, Talin und Vinculin in perinukleäre Bereiche der Zelle sowie eine starke Abnahme der Gesamtmenge an F-Aktin beobachtet werden. Weiter wird der Abbau des Oberflächenproteins Fibronectin beschrieben (Ahlgren et al. 1983; Fiorentini et al. 1990; Müller et al. 1992; Ottlinger et al. 1988).

1.2.1.2 Modifikation von Rho-Proteinen durch TcdB

Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts steht im Zusammenhang mit der kovalenten Modifikation von Rho, Rac und Cdc42. Diese niedermolekularen GTPasen werden durch TcdB spezifisch glucosyliert. Dabei überträgt TcdB einen Glucoserest auf die in der Effektorbindedomäne gelegene

Hydroxylgruppe des Thr-37 (RhoA) bzw. des Thr-35 (Rac1, Cdc42) (Hofmann et al. 1997; Just et al. 1995b, 2004) [**Abb. 4**].

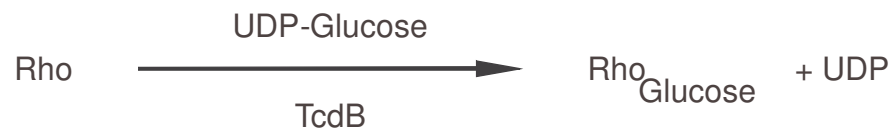


Abb. 4: TcdB-vermittelte Glucosylierung von Rho-Proteinen. TcdB mono-glucosyliert die niedermolekularen Rho-Proteine an Thr-37 (Rho) bzw. Thr-35 (Rac, Cdc42) unter Verwendung des Kosubstrates UDP-Glucose.

Der Glucoserest verhindert die für die Effektorbindung nötige Konformationsänderung in der Schalterregion-1, die in der inaktiven Konformation verbleibt. Es kommt zur Inhibierung der Interaktion zwischen dem Rho-Protein und seinem Effektorprotein und zur Blockade der Bindung von GAPs an die entsprechenden GTPasen. Der Zytosol-Membran-Zyklus wird durch die ebenfalls unterbundene Bindung von GDI und Rho-Protein negativ beeinflusst [**Abb. 5**]. Die Glucosylierung hat letztlich die Inaktivierung der Rho-Proteine zur Folge, die in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts mündet (Just et al. 2004; Sehr et al. 1998; Vetter et al. 2000).

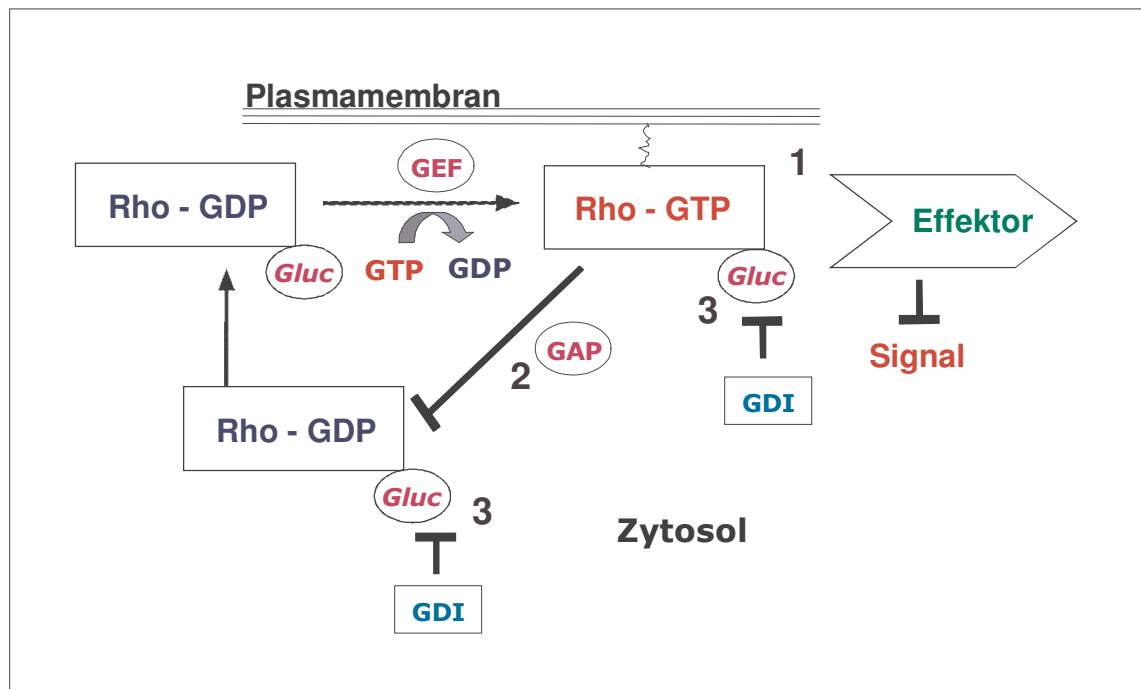


Abb. 5: Inaktivierung der Rho-Proteine durch ihre Glucosylierung durch TcdB. Die Glucosylierung der Rho-Proteine durch TcdB führt zur Inaktivierung der GTPasen. Die für die Effektorbindung nötige Konformationsänderung in der Schalterregion-1 wird inhibiert, die Interaktion der GTPasen mit den Effektorproteinen unterbunden und die Signalvermittlung damit blockiert [1]. Der Glucoserest blockiert weiterhin die Bindung von GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) [2] und Guaninnukleotid-Dissoziationinhibitoren (GDIs) [3]. Die GTPase-Aktivierung wird inhibiert und die GDIs können die GTPasen nicht mehr aus der Membran lösen. Die Folge ist eine Sequestrierung von GTP-gebundenen, aber inaktiven Rho-Proteinen an der Membran.

1.2.2 Einfluss der Modifikation von Rho-Proteinen durch TcdB

1.2.2.1 Intrazelluläre Lokalisation glucosylierter Rho-Proteine

Glucosyliertes, inaktives RhoA bindet wie aktiviertes, unmodifiziertes RhoA an die Membran. Dabei konnte für RhoA gezeigt werden, dass sich das Zytosol-Membran-Gleichgewicht von RhoA nach seiner Glucosylierung in Richtung Membran verschiebt. Durch die Modifikation von RhoA kommt es zur Blockade der GTPase-GDI-Interaktion, welche eine Voraussetzung für die Lösung der Rho-Proteine aus der Membran darstellt (Genth et al. 1999; Nomanbhoy et al. 1999). Just et al. (1995b) beobachteten nach der Mikroinjektion von

glucosyliertem RhoA die gleichen morphologischen Veränderungen kultivierter Zellen wie nach der extrazellulären Applikation von TcdB. Daher wurde ein Modell der dominant-negativen Wirkung von glucosyliertem RhoA aufgestellt: Die vorgeschlagene dominant-negative Wirkung basiert auf der fehlenden RhoA-GDI-Interaktion. Da die Bindung von GDI an die Rho-Proteine durch die Glucosylierung inhibiert ist, werden diese nicht aus der Membran gelöst. Die inaktiven GTPasen sequestrieren damit dauerhaft die putativen Rho-Bindestellen an der Plasmamembran. Die Membranassoziation und Aktivierung von unmodifiziertem RhoA unterbleibt und die RhoA-abhängige Signalübermittlung wird inhibiert. Es kommt zur Disaggregation des Aktinzytoskeletts und letztlich zum Zelltod. Dieses Modell beinhaltet ebenfalls eine Sequestrierung von glucosyliertem Rac1 und Cdc42 an der Membran.

Einen Beitrag zur zytotoxischen Wirkung von TcdB könnte aber auch ein Einfluss der Glucosylierung von RhoA auf seine Verteilung innerhalb des Membrankompartimentes darstellen, die mit einer veränderten Funktion von RhoA einhergehen könnte. Ein Hinweis stellt die folgende Beobachtung dar: Das *C. botulinum* Exotoxin C3-Transferase ADP-ribosyliert spezifisch RhoA, RhoB und RhoC. Diese Modifikation führt ebenfalls zu einer Inaktivierung seiner Substrate RhoA, RhoB und RhoC (Genth et al. 2003; Sekine et al. 1989). Für ADP-ribosyliertes, inaktives RhoA konnte bereits eine Translokation von der Caveolae-Domäne in die Nicht-Caveolae-Domäne beobachtet werden (Michaely et al. 1999).

1.2.2.2 Stabilität glucosylierter Rho-Proteine

Die Funktion der Rho-Proteine ist nicht nur vom GTPase-Zyklus und ihrer Lokalisation abhängig, sondern wird ebenfalls indirekt über ihre intrazelluläre Proteinkonzentration reguliert.

Die Modifikation von Rho-Proteinen durch das *E. coli* Toxin CNF-1 nimmt Einfluss auf die Stabilität der Proteine. CNF-1 ist eine Glutamin-Deamidase, die spezifisch einen Glutaminrest in der Schalterregion-2 (Aminosäureposition 63) von RhoA bzw. an der entsprechenden Position 61 von Rac1 und Cdc42

deamidiert. Dieser Aminosäurerest ist essentiell für die GTPase-Aktivität der Rho-Proteine. Die Modifikation führt zur Inhibierung der intrinsischen und GAP-stimulierten GTPase-Aktivität. Diese Inhibierung hat eine konstitutive Aktivierung der Rho-Proteine zur Folge, die in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Zellausbreitung nach Applikation von CNF-1 auf kultivierte Zellen mündet (Doye et al. 2002; Flatau et al. 1997, 2000). Die Aktivierung erfolgt transient. Die konstitutiv aktiven Formen von Rho, Rac und Cdc42 werden anschließend ubiquitinyliert und proteasomal degradiert. Konstitutiv aktive Mutanten der Rho-Proteine werden ebenfalls beschleunigt degradiert (Doye et al. 2002, Lerm et al. 2002, Senadheera et al. 2001).

Im Gegensatz zu den konstitutiv aktiven Rho-Proteinen gibt es keine eindeutigen Daten zur Stabilität der glucosylierten, dominant negativen Rho-Proteine. Rac1 konnte von Dillon et al. (1995) in modifizierter Form nachgewiesen werden. Dagegen wurde mehrfach eine schnelle Degradation des Rac1-Proteins nach seiner Glucosylierung beschrieben (Clerk et al. 2001; Hahn et al. 2002; Chaves-Olarte et al. 2003).

Die intrazelluläre Proteinkonzentration kann außer über die Stabilität der Proteine ebenfalls indirekt über die Genexpression reguliert werden. Kürzlich wurde erstmals von Gerhard et al. (2005) gezeigt, dass es nach der Applikation von TcdA auf kultivierte Zellen zu einem Anstieg der Proteinkonzentration eines Rho-Proteins kam. Das clostridiale Toxin übt damit nicht lediglich einen hemmenden Einfluss auf die unmittelbare Funktion der GTPasen infolge der Effektorbindungsblockade aus, sondern besitzt ebenfalls einen Effekt auf die Regulation der Proteinkonzentration seines Proteinsubstrates.

2 Zielsetzung

Die Regulation der niedermolekularen GTPasen der Rho-Subfamilie erfolgt über einen GTPase-Zyklus, einen Zytosol-Membran-Zyklus sowie indirekt über ihre intrazelluläre Proteinkonzentration. Der Einfluss der großen clostridialen Zytotoxine (GCZ) auf den GTPase-Zyklus der Rho-Proteine wurde bereits weitgehend aufgeklärt. In dieser Arbeit soll

- der Einfluss von *C. difficile* Toxin B (TcdB) auf die intrazelluläre Proteinkonzentration sowie die Stabilität von Rac1 und RhoB
- der Einfluss von TcdB auf die intrazelluläre Lokalisation von RhoA

untersucht werden.

Den Hintergrund der Fragestellungen bilden folgende Befunde:

1. TcdB glucosyliert und inaktiviert spezifisch Rho-Proteine. Während für glucosyliertes RhoA eine Rolle in der Toxin-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts nachgewiesen ist, ist unklar, welche Relevanz modifiziertes Rac1 in diesem Zusammenhang besitzt. Beobachtungen, die eine schnelle Degradation des glucosylierten Rac1 zeigen, stellen eine Funktion des glucosylierten Rac1 in der Toxin-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Frage. Demgegenüber schlagen Boquet et al. (2003) vor, dass die wichtigsten Wirkungen der Toxine durch Rac1 vermittelt werden, da es ein Substrat aller GCZ darstellt.
2. Nach der Applikation von *C. difficile* Toxin A (TcdA) auf kultivierte Zellen stieg die Proteinkonzentration der GTPase RhoB an. Damit zeigt ein GCZ nicht nur einen Einfluss auf die eigentliche Funktion, sondern ebenfalls eine Auswirkung auf die Regulation der Proteinkonzentration einer Substrat-GTPase. Der Einfluss von TcdB

auf das RhoB-Protein soll untersucht und im Detail charakterisiert werden.

3. Es gibt Hinweise, dass die Membranmikrodomäne Caveolae im Zusammenhang mit der Regulation der Rho-Proteine über den Zytosol-Membran-Zyklus die Plattform für die koordinierte Signalvermittlung der GTPasen darstellt und RhoA an der Regulation dieser Domäne beteiligt ist. Eine veränderte subzelluläre Lokalisation glycosylierter Rho-Proteine könnte eine Rolle in der zytotoxischen Wirkung von TcdB spielen. Einen Hinweis stellt die beobachtete Translokation von ADP-ribosyliertem RhoA von der Caveolae-Domäne in die Nicht-Caveolae-Domäne dar.

3 Material

3.1 Zelllinien und Medien

- Caco-2-Zellen (Humane, epitheliale Colon-Carcinomazellen)
- MDCK (NBL-2)-Zellen (Epitheliale Nierenzellen des Hundes)
- NIH3T3-Zellen (Mäusefibroblasten)

Wachstumsmedium für Caco-2-Zellen:

DMEM /10 % FCS / 1 mM Natrium-Pyruvat / Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ ml

Wachstumsmedium für MDCK-Zellen:

MEM EARLE / 10 % FCS / 1 % NEA

Wachstumsmedium für NIH3T3-Zellen:

DMEM/10 % FCS/1 mM Natrium-Pyruvat

3.1.2 Originär gereinigte Toxine

| Bakterienstamm | Enzym |
|-------------------------------------|--|
| <i>C. difficile</i> Stamm VPI 10463 | Toxin B = TcdB ₁₀₄₆₃ |
| <i>C. difficile</i> Stamm VPI 10463 | Toxin B564 = TcdB ₁₀₄₆₃ , katalytische Domäne |

3.2 Kits und Substanzen für DNA- und RNA-Arbeiten

- 5 x Ready Reaction Premix Sequencing Buffer
- DNA-Marker: Hind III verdaute Lambda-DNA: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 bp
- E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab)
- Omniscript RT Kit (QIAGEN; # 205111)
- QIAshredder (QIAGEN; # 79654)

- RNase-Free DNase Set (QIAGEN; # 79254)
- RNase-Inhibitor (Q-BIOgene; # RNAI0001)
- RNeasy Mini Kit (QIAGEN; # 74104)
- Sawady *Taq*-Polymerase mit 10x PCR-Puffer (PeqLab)

3.3 Primer

| | |
|------------------------|--------------------------------------|
| GAPDH-Antisense-Primer | 5'-CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3' |
| GAPDH-Sense-Primer | 5'-CTC ACG GCA AAT TCA ACG GCA-3' |
| RhoB-Antisense-Primer | 5'-TCA TAG CAC CTT GCA GCA GTT-3' |
| RhoB-Sense-Primer | 5'-GCG TGC GGC AAG ACG TGC CTG-3' |

Alle Primer von MWG BIOTECH AG (0,01 μ mol, HPSF, Standard), dNTPs (PeqLab)

Oligo-dT Primer 18-mer (MWG BIOTECH AG; 0,01 μ mol, HPSF, Standard)

Random Primer (Promega ; # C 1181)

3.4 Plasmide

- pGEX-2T-GL-Rac1 bzw. -RhoA bzw. -Cdc42
- pEGFP-C1-Rac1 bzw. -RhoA

3.5 Antikörper

| Antikörper | Hersteller | Verdünnungen in TBST |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------|
| goat anti-Rac1 | SantaCruz; # sc-6084 | 1 : 300 |
| HRP-labelled donkey anti-goat IgG | SantaCruz; # sc-2020 | 1 : 2000 |
| HRP-labelled goat anti-mouse IgG | Rockland; # 610-103-121 | 1 : 2000 |
| HRP-labelled goat anti-rabbit IgG | Rockland | 1 : 2000 |

| | | |
|-----------------------------|---------------------------------|----------|
| mouse anti-Cdc42 IgG (mAb) | Transduction Lab.; # 610929 | 1 : 250 |
| mouse anti-Rac1 IgG (mAb) | Transduction Lab.; # sc-6084 | 1 : 2000 |
| mouse anti-RhoA IgG (mAb) | Santa Cruz; # sc-418 | 1 : 200 |
| mouse anti-RhoB IgG (mAb) | Santa Cruz; # sc-8048 | 1 : 100 |
| rabbit anti-Caveolin (pAb) | Transduction Lab.; # 610060 | 1 : 5000 |
| rabbit anti-GDI-1 IgG (pAb) | SantaCruz; # sc-259 | 1 : 2000 |
| rabbit anti-GFP (pAb) | Invitrogen; # R970-01 | 1 : 5000 |
| rabbit anti-GST (pAb) | Santa Cruz; # sc-459 | 1 : 200 |

3.6 Geräte

- ABI PRISM 310 Genetic Analyser
- Bandelin Sonoplus
- Beckman Ultrazentrifuge L8 70M; Rotoren SW 40 Ti, SW41Ti
- Biofuge primo R (Heraeus)
- Certomaten: Brown Biotech/INOVA 4330; New Brunswick Scientific
- Dounce-Homogenisator
- Elektrophorese-System, Keutz Labortechnik
- Eppendorf ThermoStat plus
- Eppendorf Zentrifuge 5415R
- Fluoreszenzmikroskop HAL 100 (Zeiss)
- French Pressure Cells and Press, Spectronic Unicam
- Gel Dryer, Bio-Rad Modell 543
- Heraeus Megafuge 1.0R
- iCycler, BIORAD
- Image Station 440CF, Kodak digital science
- Inkubator HERA cell (Kendro)

- Naßblotter
- Phosphorimager, Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard
- Photometer, Bio-Rad SmartSpec 3000 mit Mikroquarzküvette
- Sorvall Ultrazentrifuge RCM150GX; Rotor S120AT2
- Sorvall Zentrifuge RC5B Plus; Rotoren F7, F10, F14, F21S

3.7 Verbrauchsmaterial

- Centrifuge Tubes 14 x 95 mm (Beckman; # 331374)
- Einmalpipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße waren von Sarsted (Nürnbrecht).
- Nitrocellulose Transfer Membrane: Protran, 0,2 μm (Schleicher&Schuell; # 10401396)
- PVDF Transfer Membrane: Hybond-P, 0,45 μm (Amersham biosciences; # RPN303F)
- Quick Seal Centrifuge Tubes (Beckman; # 355537)
- Whatman-Filterpapier: (Schleicher&Schuell; # 10426694)
- Zellkulturflaschen EasYFlask (75 cm^2), Reagenzröhrchen (50 und 15 ml): Nunc

3.8 Chemikalien und sonstige Materialien

- 100 x Purified BSA (Bovine Serum Albumin) (Bioengland; # B 90015)
- 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) (free acid)
- Acrylamid-Rotiphorese Gel 30 (Roth)
- Actinomycin D, *Streptomyces sp.* (CALBIOCHEM; # 114666)
- Agarose für DNA-Elektrophorese (PeqLab)
- Ampicillin (SERVA)
- Ammonium-Persulfat (APS) (SIGMA)
- Bactotryptone (BD)

- Bromphenolblau (MERCK)
- Coomassie Brilliant Blue R 250 (MERCK)
- Coomassie-Protein Assay Reagent (Bradford-Reagenz) (Fluka; # 27813)
- Cycloheximid (CHX) (SIGMA; # C7698)
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) (97 %) (SIGMA)
- Dithiothreitol (DTT) (SERVA)
- Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) (Biochrom; # FG 0435)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (SIGMA)
- Fötale Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert, (Biochrom; # S 0115)
- Guanosin-5'-diphosphat (GDP) (Boehringer Mannheim; # 85753720)
- Glutathion Sepharose 4B (Amersham pharmacia biotech; # 27-4574-01) in 20% EtOH_(wäßrige Lsg.)
- Glutathion, reduziert (SIGMA)
- Guanosin-5'-o-(3-thiotriphosphat) (GTP γ S) (CALBIOCHEM; # 371545)
- Isopropylthiogalactosid (IPTG) (SIGMA)
- Lactacysin, Synthetic (CALBIOCHEM; # 426100)
- MEM EARLE Medium (Biochrom; # FG 0325)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) (Biochrom; # K 0293)
- Penicillin/Streptomycin (Biochrom; # A 2213)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (SERVA)
- PolyFect Transfection Reagent (QIAGEN; # 301105)
- Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (BIO RAD; # 161-0305)
- Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, complete, EDTA-free (Roche; # 1873580): 10 x Stammlösung (1 Tab./2,5 ml H₂O)
- Sodiumdodecylsulfat (SDS) (PIERCE)
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (PIERCE; # 34094)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (SIGMA)

- Thrombin: Roche EC 34215
- Trichloressigsäure (TCA) (MERCK)
- Triton X-100 (SIGMA)
- Trypsin/EDTA (Biochrom; # L 2153)
- Tween-20-Detergens (BIORAD)
- UDP-[¹⁴C]-Glucose: (Amersham Biosciences; # OFB.129 bzw. NEN Life Science; # ARC.154)
- Yeast Extract (BD)

Nicht separat aufgeführte Chemikalien wurden von MERCK (Darmstadt), ICN Pharmaceuticals (Eschwege), FLUKA, SERVA Feinbiochemie (Heidelberg), SIGMA (Deisenhofen), FEROSA sowie BIOZYM (Hessisch Oldendorf) bezogen. Aceton, MetOH, EtOH, Isopropanol und Essigsäure waren von J.T. Baker.

3.9 Lösungen

| | |
|---|---|
| 1 x Laufpuffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS |
| 10 x Glucosylierungspuffer | 500 mM HEPES (pH 7,5), 1 M KCl, 1mg/ml BSA, 20 mM MgCl ₂ |
| 10 x Formaldehyd-Agarosegel (FAG)–Puffer (pH 7,0) | 200 mM MOPS (free acid), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in DEPC-Wasser |
| 1 x FAG-Laufpuffer | 100 ml 10x FAG-Puffer, 20 ml 37 % (12,3 M) Formaldehyd, 880 ml DEPC-Wasser |
| 5 x denaturierender Laemmli-Puffer | 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 100 mM DTT, 3 % Glycerol, 2 mg/ml Bromphenolblau |
| 5 x DNA-Probenpuffer | 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 0,04 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol |
| 5 x RNA-Probenpuffer | 16 µl gesättigte wässrige Bromphenolblau- |

| | |
|--------------------------|--|
| | Lösung, 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0) 20 µl 37 % (12,3 M) Formaldehyd, 2 ml Glycerol, 3,084 ml Formamid, 4 ml 10x FAG-Puffer ad 10 ml DEPC-Wasser |
| Blocklösung | 5 % Milchpulver in TBST |
| Blotpuffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % MetOH |
| Coomassie-Entfärbelösung | 75 ml Essigsäure 96 %, 50 ml MetOH, H ₂ O bidest ad 1L |
| Coomassie-Färbelösung | 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 454 ml MetOH, 92 ml Essigsäure 96 %, H ₂ O bidest ad 1 L |
| DEPC-Wasser | 1 ml DEPC/1 L Aqua bidest, Inkubation für 12 h bei 37 °C, Inaktivierung von DEPC durch Autoklavieren |
| Fixierlösung | 4 % [w/v] Paraformaldehyd, 0,1 % [v/v] Triton X-100, 50 mM NH ₄ Cl |
| Glutathion-Puffer | 50 mM Tris (pH 8,0), 10 mM Glutathion, 2,5 mM MgCl ₂ |
| Glycin-Stripping-Puffer | 0,2 M Glycin (pH 2,2), 0,1 % SDS, 1 % Tween-20 |
| LB-Medium | 1 % Bactotryptone, 0,5 % Yeast Extract, 1 % NaCl, 50 mg/l Ampicillin bzw. Kanamycin |
| Lysispuffer 1 | 50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, 1 mM PMSF, Protease-Inhibitoren-Cocktail (1:10) |
| Lysispuffer 2 | PBS, 0,2 % Triton X-100, 1 µ/ml Leupeptin, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF |
| Lysispuffer 3 | 20 mM Tris (pH 7,4), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 % Triton X-100 |

| | |
|--|---|
| Mes-buffered-saline-Puffer (MBS) | 25 mM Mes, 150 mM NaCl, pH 6,5 |
| Mowiol-Einbettmedium | 200 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 % (w/v) Mowiol, 25 % (v/v) Glycerol |
| Natriumcarbonat-Lösung (pH 11,0) | 500 mM Natriumcarbonat, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, Protease-Inhibitoren-Cocktail (1:10) |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,5 | 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ |
| Ponceau-Lösung | 0,15% PonceauS in 0,5% Essigsäure |
| Sucrose-Lösungen | 90% Saccharose in MBS 35% Saccharose in MBS/250 mM Natriumcarbonat 05% Saccharose in MBS/250 mM Natriumcarbonat |
| Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer | 40 mM Trisacetat, 10 mM EDTA, pH 7,8 |
| Tris-buffered-saline mit Tween-20-Detergens (TBST) | 50 mM Tris (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween- 20-Detergens |
| Tris-EDTA (TE)-Puffer | 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA |
| Thrombinspaltpuffer | 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl ₂ , 2,5 mM CaCl ₂ |
| Tyrodepuffer | 10 mM HEPES (pH 7,4), 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,4 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 5,6 mM Glucose |

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden nur sterile Lösungen und Materialien verwendet. Alle Lösungen wurden auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden 2 – 3 x pro Woche passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt und bei RT (NIH3T3-Zellen), bzw. 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vom Kulturgefäß lösten. Die Reaktion wurde durch Zugabe des äquivalenten Volumens an Medium gestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 800 x g abzentrifugiert, in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und nach Bedarf neu ausgesät. Alle Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

4.1.2 Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten

Die transiente Transfektion von Zellen mittels PolyFect Transfection Reagent erfolgt über die Komplexierung der einzubringenden DNA mit und durch das Reagenz. Seine positive Ladung erlaubt die Bindung an negativ geladene Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Nach der Aufnahme in die Zelle wird infolge der Abpufferung des pH-Wertes in den Lysosomen durch das Reagenz die lysosomale Nuklease inaktiviert, wodurch die DNA intakt in den Nukleus gelangen und dort translatiert werden kann.

Durchführung:

NIH3T3-Zellen wurden am Vortag auf Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion ca. 70 % konfluent waren. Die Inkubation über Nacht erfolgte in Wachstumsmedium unter Standardbedingungen.

Transfektion von in 3,5 cm-Zellkulturschalen gewachsene Zellen: 2,5 µg pEGFP-C1-RhoA- bzw. pEGFP-C1-Rac1-DNA wurden in 100 µl serumfreiem Medium mit 10 µl PolyFect Transfection Reagent bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 1,5 ml Wachstumsmedium inkubiert. Nach 15 min wurde der DNA-Reagenz-Mix in 0,6 ml Wachstumsmedium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 20 h unter Standardbedingungen inkubiert.

Transfektion von in 10 cm-Schalen gewachsene Zellen: 4 µg pEGFP-C1-RhoA- bzw. pEGFP-C1-Rac1-DNA wurden in 300 µl serumfreiem Medium mit 25 µl PolyFect Transfection Reagent bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 7 ml Wachstumsmedium inkubiert. Nach 15 min wurde der DNA-Reagenz-Mix in 1 ml Wachstumsmedium aufgenommen und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 20 h unter Standardbedingungen inkubiert und die erfolgreiche Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 509 nm überprüft.

4.1.3 Zytotoxizitätsassay

Das Medium der jeweiligen konfluent gewachsenen Zellen wurde vor Intoxikation der Zellen mit TcdB auf 1 ml (3,5 cm-Zellkulturschalen), bzw. 6 ml (10 cm-Zellkulturschalen) reduziert. Die Vergiftung der Zellen erfolgte mit der im jeweiligen Versuch angegebenen Konzentration an Toxin. Die Zellen wurden anschließend für die im jeweiligen Versuch angegebenen Zeiten bis zur Zellernte unter Standardbedingungen kultiviert.

4.1.4 Hemmung der Proteindegradation durch den Proteasomen-Hemmer Lactacystin

NIH3T3-Zellen wurden mit einer Konzentration von 30 µM Lactacystin für die im jeweiligen Versuch angegebene Zeit unter Standardbedingungen inkubiert. Bei Intoxikation der Zellen mit TcdB wurden die Zellen zeitgleich mit Lactacystin und TcdB inkubiert.

4.1.5 Hemmung der Transkription durch den Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase Actinomycin D

Das Medium konfluent auf 3,5 cm-Zellkulturschalen gewachsener NIH3T3-Zellen wurde auf 1 ml reduziert. 5 µg/ml Actinomycin D wurden dem Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Nach 30 min wurden die Zellen +/- 50 ng/ml TcdB vergiftet und für die im jeweiligen Versuch angegebenen Zeiten bis zur Zellernte unter Standardbedingungen kultiviert.

4.1.6 Hemmung der Proteinsynthese durch den Proteinbiosynthese-Hemmer Cycloheximid

Caco-2-Zellen wurden mit einer Konzentration von 25 µM Cycloheximid für die im jeweiligen Versuch angegebene Zeit unter Standardbedingungen inkubiert.

4.1.7 Rhodamin-Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts

Die Inaktivierung der Rho-GTPasen durch TcdA und TcdB äußert sich morphologisch in einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts, die sich durch Fluoreszenzmarkierung des Aktins mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgen lässt.

Durchführung:

Nach mikroskopischer Betrachtung auf Coverslips gewachsener Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Tyrode-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden fixiert, indem sie mit proteinvernetzender, formaldehydhaltiger Fixierlösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit Tyrode-Puffer gewaschen, bevor das Aktinzytoskelett mit 3 U/ml Rhodamin-Phalloidin in Tyrode-Puffer angefärbt wurde. Die Inkubation für 30 min erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch. Erneut wurden die Zellen dreimal mit Tyrode-Puffer gewaschen. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Mowiol gegeben und der mit den Zellen behaftete Coverslip aufgelegt. Die Betrachtung der Objekte erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 573 nm.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Gewinnung von Zelllysat

Adhärente Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in Lysispuffer 1 aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die Kernfraktion für 10 min bei 4 °C, 2000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand stellte das „Zelllysat“ dar.

4.2.2 Expression und Fällung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die GTPasen wurden als GST-Fusionsprotein aus *Escherichia coli* pGEX-2T-GL/ TG1 aufgereinigt.

Die Präzipitation von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Proteinen aus dem Proteingemisch von Zelllysat erfolgt durch die Bindung von GST an Glutathionsepharose.

Die Expression der GST-RhoA-, -Rac1-, -Cdc42- und -Ras-Proteine erfolgte in *Escherichia coli*. Zur Anzucht wurden je 50 ml LB-Medium mit Keimen der entsprechenden Glycerinstöcke angeimpft. Ampicillin diente der Selektion der transformierten Bakterien. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 175 rpm im Certomaten inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf jeweils 2 l frisches Medium überimpft. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C und 175 rpm im Certomaten weiter inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 200 µM IPTG. Die Kulturen wurden unter oben genannten Bedingungen für 3h weiter inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 20 min bei 5000 rpm, 4 °C in der Sorvall Zentrifuge (Rotor F7) wurden die entsprechenden Bakterienpellets gewonnen. Die Pellets wurden in 11/2-fachem Volumen an Lysispuffer 3 resuspendiert. Die Zellen wurden mittels French Press in der 40K-Zelle bei 1000 psi und anschließendem Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde bei 14.000 rpm (F21S) für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Glutathion-Sepharose-Beads versetzt und 11/2 h bei RT über Kopf geschüttelt. Die Beads wurden zuvor 3 x mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend

wurden die mit den GST-Fusionsproteinen beladenen Beads für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Beads wurden 5 x mit Lysispuffer 3 gewaschen.

4.2.3 Mobilisierung von GST-Fusionsproteinen durch Elution mit Glutathion

Die Mobilisierung der GST-Proteine erfolgte durch ihre Elution von der Sepharosematrix mit einem äquivalenten Volumen an 37 °C warmen Glutathionpuffer. Dazu wurden die Lösungen bei RT für 15 min über Kopf geschüttelt und die Beads anschließend für 2 min bei 13.000 rpm, 4 °C in der Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert. Das GST-Fusionsprotein lag im Überstand vor. Die erfolgreiche Proteingewinnung wurde durch eine Anfärbung der Proteine mit Coomassie nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE in einem 12,5 %igen SDS-Gel überprüft.

4.2.4 Mobilisierung der Rho-GTPasen mittels Thrombinverdau

An Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelte GST-Fusionsproteine der jeweiligen GTPasen wurden gewonnen (s. 4.2.1.1). Die Beads wurden in 1 ml Thrombinspaltpuffer mit 1 Unit Thrombin resuspendiert. Durch den Thrombinverdau für 1 h bei RT im Über-Kopf-Schüttler wurden die gewünschten Proteine von der Sepharosematrix mobilisiert, wobei der GST-Carrier an der Sepharose verblieb. Die verbleibenden GST-Beads wurden für 2 min bei 13.000 rpm, 4 °C in der Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert. Die aufgereinigten Proteine lagen im Überstand vor. Das Thrombin wurde anschließend durch Zusatz von 1 mM PMSF inaktiviert. Die erfolgreiche Abspaltung der Proteine wurde durch eine Anfärbung der Proteine mit Coomassie nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE in einem 12,5 %igen SDS-Gel überprüft.

4.2.5 Glucosylierung von Rho-GTPasen

4.2.5.1 *Radioaktive Glucosylierung von Rho-Proteinen im Lysat*

Zelllysate wurden mit rekombinantem GST-Rac1-Fusionsprotein (1 µg/ml) +/- Lactacystin (30 µM) sowie +/- TcdB (10 ng/µl) versetzt. In Anwesenheit von 40 µM UDP-[¹⁴C]-Glucose wurden die Ansätze 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Glucosylierung wurde mittels Phosphorimager dokumentiert.

4.2.5.2 *Radioaktive Glucosylierung von Rho-Proteinen im Puffersystem*

Rekombinante Rho-GTPasen (40 µg/ml) wurden in Anwesenheit von 10 µM UDP-[¹⁴C]-Glucose für 10 min bei 37 °C mit 40 µg/ml TcdB 546-Fragment in Glucosylierungspuffer inkubiert. Die Proben wurden Laemmli-Puffer versetzt. Rekombinantes GST-Rac1-Fusionsprotein wurde in Anwesenheit von 20 µM UDP-[¹⁴C]-Glucose für 30 min bei 37 °C mit jeweils 40 µg/ml TcdB in Glucosylierungspuffer inkubiert. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt. Die Glucosylierung wurde mittels Phosphorimager dokumentiert.

4.2.6 Isolierung von Zellkompartimenten

4.2.6.1 *Zytosol-Membran-Trennung mittels Ultrazentrifugation*

Die Trennung von Zytosol- und Membranfraktion erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Zellen wurden in Lysispuffer 1 aufgenommen und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde mittels Ultrazentrifugation fraktioniert (1 h bei 92.000 x g). Der Überstand enthielt die zytosolische Fraktion. Das Pellet wurde mit Lysispuffer 1 gewaschen und resuspendiert.

4.2.6.2 *Sucrose-Dichtezentrifugation*

- *Auftrennung von Zelllysate im Sucrosetufengradienten (Flotationsprinzip)*

MDCK-Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in eiskalter 500 mM Natriumcarbonat-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines

Homogenisator sowie durch anschließenden Ultraschall (3 x 20 sec bei 20%) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (4300 Upm, 10 min) wurde der postnukleäre Überstand gewonnen. 1 ml Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an eiskalter 90 %iger Sucroslösung versetzt und gemischt. Die Lösung wurde auf den Boden des Zentrifugenröhrchens (14 x 95 mm) vorgelegt und mit 6 ml eiskalter 35 %iger Sucroslösung und anschließend 4 ml eiskalter 5 %iger Sucroslösung überschichtet. Die Auftrennung im Gradienten erfolgte mittels Ultrazentrifugation (20 h, 39.000 Upm) im Schwingrotor SW 40 ohne Bremse. 1 ml-Fractionen wurden von oben abgenommen. Die Fällung der Proteine erfolgte mit 10 % TCA (1 h bei 4 °C). Nach einer Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm) wurden die Pellets 3 x mit eiskaltem 80 %igem Aceton gewaschen. Die Pellets wurden getrocknet, in Lysispuffer resuspendiert und mit Laemmli-Puffer versetzt.

- *Auftrennung von Membranen im Sucrocestufengradienten (Flotationsprinzip)*

Auf 10 cm-Zellkulturschalen konfluent gewachsene MDCK-Zellen wurden mit 1,7 µg/ml TcdB unter Standardbedingungen inkubiert, bis die Zellen abrundeten. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und in eiskalter 500 mM Natriumcarbonat-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Homogenisator sowie durch anschließenden Ultraschall (3 x 20 sec bei 20%) aufgeschlossen. Eine Zytosol-Membran-Fraktionierung wurde mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Membranpellets wurden mit eiskalter 500 mM Natriumcarbonat-Lösung gewaschen und anschließend in 1 ml eiskalter 500 mM Natriumcarbonat-Lösung resuspendiert. Diese Lösung wurde mit dem äquivalenten Volumen an eiskalter 90 %iger Sucroslösung versetzt und gemischt. Die Probe wurde in einem Zentrifugenröhrchen (Quick Seal) vorgelegt und mit 2 ml eiskalter 35 %iger Sucroslösung und anschließend ca. 2,5 ml eiskalter 5 %iger Sucroslösung überschichtet. Das Röhrchen wurde versiegelt. Die Auftrennung der Membranen im Gradienten erfolgte mittels Ultrazentrifugation (18 h, 39.000 Upm) im Schwingrotor SW 41 Ti ohne Bremse. 1 ml-Fractionen wurden von oben abgenommen und mit BSA (100 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Die Fällung der Proteine erfolgte mit 10 % TCA

(1 h, 4 °C). Nach der Pelletierung der Proteine (10 min, 13.000 Upm) wurden diese 3 x mit eiskaltem 80 %igem Aceton gewaschen, anschließend getrocknet, in Lysispuffer resuspendiert und mit Laemmli-Puffer versetzt.

4.2.7 Zytosol-Membran-Translokation von Rho-Proteinen

NIH3T3-Zellen (10 cm-Zellkulturschalen) wurden transient mit pEGFP-C1-Rac1 transfiziert (Kap. 4.1.2). Anschließend wurde der Zellrasen 2 x mit PBS gewaschen und in Lysispuffer 1 aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und die Kernfraktion abgetrennt (10 min, 1500 Upm). Die Überstände wurden mit 20 µg/ml TcdB für 1 h bei 37 °C in Anwesenheit von 100 µM UDP-Glucose inkubiert. Anschließend wurde eine Nukleoidaustauschreaktion durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 1 mM GDP bzw. 1 mM GTP[γS] in Anwesenheit von 10 mM EDTA (pH 8,0) für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Absättigung des EDTAs wurde den Ansätzen 8 mM MgCl₂ hinzugefügt (Inkubation für 10 min auf Eis). Durch Ultrazentrifugation wurden die Zytosol- und Membranfraktionen gewonnen. Die Membranpellets wurden mit Lysispuffer 1 gewaschen und resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde angeglichen. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt.

4.2.8 Extraktion von RhoB aus Membranen

Auf 3,5 cm-Schalen konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 100 µl Lysispuffer 2 für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Schalen gelöst und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurde eine Zytosol-Membran-Fraktionierung durchgeführt. Der zytosolische Überstand enthielt die solubilisierten RhoB-Proteine.

4.2.9 Protein-Analyse

4.2.9.1 *Direkte Zellyse*

In 3,5 cm-Zellkulturschalen gewachsene NIH3T3-Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen.

4.2.9.2 *Proteinbestimmung nach Bradford*

10 µl der zu vermessenden Probe oder Wasser als Leerwert wurden mit 790 µl A. bidest und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen. Die Konzentration wurde aus einer Eichkurve ermittelt.

4.2.9.3 *Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Bei der hier durchgeführten Gelelektrophorese handelt es sich um die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Durch gleichzeitige Auftrennung von Proteinproben und Molekulargewichtsstandards können Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Proteine in den eingesetzten Proben erfolgen. Eine gute Auftrennung von Proteinen im erwarteten Bereich von 20 – 50 kDa wird mit 12,5 – 15 %igen Trenngelen erreicht.

Durchführung:

Es wurden 12,5 %ige SDS-Gele verwendet. Die erforderlichen Komponenten für die Herstellung des Trenngels wurden vorsichtig vermischt und in eine mit Isopropanol gereinigte Gelkammer pipettiert. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um das System während der Polymerisation sauerstofffrei zu halten und eine Austrocknung des Gels zu verhindern. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 1 h bei RT wurde die Isopropanollösung entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Das Gel sollte erneut mindestens 1 h bei RT polymerisieren. Das polymerisierte Gel wurde über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert, um vor Gebrauch frei von Radikalen zu sein.

Für die Elektrophorese wurden die Proteine mit denaturierendem Probenpuffer versetzt und 5 min für 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Der Marker wurde ebenfalls denaturiert; es wurden jeweils 5 µl eingesetzt. Der Probenpuffer enthielt einen Bromphenolblau-Anteil, der als Lauffrontmarker fungierte. Das Gel wurde in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt und der Laufpuffer in das untere und obere Pufferreservoir eingefüllt. Die Taschen wurden kurz mit Laufpuffer durchgespült und die Proben und der Marker in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 – 30 mA für die Dauer von ca. 60 min, bis der Lauffrontmarker das Gel verließ.

Gellösungen:

5 %ige Sammelgele: 0,6 ml 30 % Acrylamid, 0,8 ml 0,625 M Trispuffer (pH 6,8), 2,38 ml A. bidest, 0,08 ml APS, 0,04 ml TEMED, 0,04 ml SDS

12,5 %ige Trenngele: 4,59 ml 30 % Acrylamid, 5,28 ml 0,75 M Trispuffer (pH 8,8), 0,91 ml A. bidest, 0,11 ml APS, 0,055 ml TEMED, 0,055 ml SDS

4.2.9.4 *Proteinfärbung im Gel*

Zur Detektion von Proteinen im SDS-Gel wurde Coomassie Blue Reagenz R-250 verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst in der Färbelösung unter ständiger Bewegung bei 70 °C für 15 min angefärbt. Die anschließende Inkubation mit Entfärbelösung erfolgte für die Dauer von 30 – 60 min ebenfalls bei 70 °C unter ständiger Bewegung, bis die Proteinbanden deutlich blau gegenüber dem klaren Hintergrund hervortraten. Während dieser Zeit wurde die Entfärbelösung mehrmals getauscht. Anschließend wurde das Gel kurz mit A. bidest gespült, auf ein Whatman-Filterpapier gelegt und auf dem Vakuumtrockner getrocknet.

4.2.9.5 *Nasszellen-Western Blot*

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Für den Naßblot wurden PVDF-Membran und Whatman-Filterpapier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde 3 min in 100 %igem Methanol geschwenkt, 15 min mit A. bidest gewaschen und anschließend 10 min in

Blotpuffer äquilibriert. Die zur Apparatur gehörenden Vliese und die 4 Whatman-Filterpapiere wurden in Blotpuffer getränkt. Auf den zur Apparatur gehörenden Gittereinsatz wurden ein Vlies, darauf 2 Filterpapierlagen, die Membran, das Gel, erneut 2 Filterpapierlagen, ein Vlies und zuletzt der zweite Gittereinsatz übereinander geschichtet. Das Ganze wurde so in die vertikale Apparatur eingehängt, dass die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode zur PVDF-Membran wanderten. Der Proteintransfer wurde für 1 h bei 100 Volt im Eisbad durchgeführt.

Zur Überprüfung des Blotvorgangs wurden die Proteine reversibel für 5 min bei RT mit PonceauS-Lösung gefärbt und anschließend mit A. bidest gespült. Die Membranen wurden für die Immunodetektion eingesetzt und konnten mit radioaktiv-markierten Proteinen behaftet auch direkt mittels Phosphorimager analysiert werden.

4.2.9.6 *Immunodetektion*

Um die zu analysierenden Proteine auf der Membran selektiv sichtbar zu machen, werden spezifische Antikörper gegen diese Proteine eingesetzt. Zur Signalverstärkung werden speziesspezifische Zweitantikörper eingesetzt, die gegen die Fc-Domänen der primären Antikörper gerichtet sind. Die sekundären Antikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert, um eine empfindliche Detektion zu ermöglichen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wird die Membran zuvor in einer Proteinlösung (Blocklösung) inkubiert, deren Proteine die Antikörper nicht erkennen. Diese verhindern unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran. Die Detektion erfolgt mittels Elektrochemolumineszenz-Verfahren. Dabei katalysiert die Meerrettich-Peroxidase eine Reaktion der Detektionslösung- Komponenten, die mit der Emission von Licht verbunden ist. Das emittierte Licht und damit der Nachweis der spezifisch gebundenen Peroxidase (Antikörperbindung) kann mit unterschiedlichen Verfahren dokumentiert werden.

Durchführung:

Nach Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese 5 min in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit Blocklösung

inkubiert und anschließend kurz mit TBST gespült. Die Membran wurde dann mit der jeweilige Erstantikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBST (3 x 10 min) entfernt. Die Membran wurde anschließend mit dem speziesspezifischen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 30 min inkubiert und erneut wie oben gewaschen. Die Membran wurde 1 min in frisch hergestellter ECL-Lösung inkubiert und die Proteinbanden mit dem Kodak-Imager-System sichtbar gemacht.

4.2.9.7 *Strippen von Membranen*

Um unterschiedliche Proteine auf der selben Membran zu detektieren, ist es notwendig die Antikörper der vorhergegangenen Detektion von der Membran zu entfernen. Dazu wurde die Membran für 2 h bei 37 °C mit Glycin-Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Der Erfolg wurde überprüft, indem die Membran für 30 min mit Blocklösung sowie 30 min mit dem jeweilig vorher eingesetzten Zweitantikörper inkubiert wurde. Nach dem Waschen (3 x 10 min in TBST) der Membran, wurde sie 1 min in ECL-Lösung inkubiert und mittels Kodak-Imager-System ausgewertet. Nach erfolgreichem Entfernen aller Erstantikörper sollte kein Signal zu detektieren sein. Die Membran wurde 3 x 10 min mit TBST gewaschen und dann erneut für die Immunodetektion eingesetzt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Lösungen und Materialien waren steril. Lösungen und Materialien für die RNA-Isolierung und RT-PCR zusätzlich Rnase-frei.

4.3.1 **Aufreinigung von pEGFP-C1-RhoA- und pEGFP-C1-Rac1-Plasmid-DNA**

pEGFP-C1-RhoA- und pEGFP-C1-Rac1-Plasmid-DNA wurden in *E. coli* amplifiziert. Zur Anzucht wurden 15 ml LB-Medium mit Keimen des jeweiligen

Glycerinstockes angeimpft. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch Zusatz von Kanamycin. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 175 rpm im Certomaten inkubiert. Die Bakterienpellets wurden mittels Zentrifugation gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid-Miniprep-Kits Lab isoliert. Mittels im Kit enthaltener Puffer wurden die Bakterien lysiert, RNA und Proteine extrahiert und die DNA auf eine Säulenmatrix gegeben. Nach der Zentrifugation von 1 min bei 13.000 Upm in der Eppendorffzentrifuge wurde die an die Säule gebundene DNA mit Puffer gewaschen. Zur Elution der DNA wurden 60 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben, 10 min bei RT inkubiert und 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.

4.3.1.1 *Bestimmung der DNA-Konzentration*

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \times c \times d$) ist es möglich, die Konzentration einer Nukleinsäurelösung bei bekanntem Extinktionskoeffizienten photometrisch zu bestimmen (Diehl et al., 1981). Bestimmung des DNA-Gehaltes: $A_{260 \text{ nm}} \times 50 = \mu\text{g/ml DNA}$.

4.3.2 **mRNA-Analyse mittels semiquantitativer RT-PCR**

Die RT-PCR ist eine eine hochsensitive Methode, mit der man die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen kann. Bei der RT-PCR wird isolierte mRNA unter Verwendung der Reversen Transkriptase, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die in der anschließenden PCR als Matrizenmaterial dient. Die RT-PCR erlaubt so die Abschätzung des Expressionsverhaltens eines spezifischen Gens, bzw. der relativen Menge einer spezifischen mRNA. Ein Problem bei der semiquantitativen RT-PCR bilden die Effektivitätsschwankungen von 5 – 90 % innerhalb der RT-Reaktion. Um dieses System zu eichen, wird eine mRNA konstanter Menge als Standard gewählt. Als interner Standard wird das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet, das im Energiestoffwechsel eine zentrale Rolle spielt und dessen kodierendes Gen ein sogenanntes Haushaltsgen darstellt. Haushaltsgene werden in allen Zellen

entwicklungsunabhängig konstitutiv expremiert. Es wird angenommen, dass dieses Gen auch während der Dauer der Intoxikation der Zellen mit TcdB auf einem gleichbleibenden Niveau expremiert wird. Zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse wird von der densitometrischen Stärke des PCR-Signals des jeweiligen RhoB-Amplikons und dem Werte der dazugehörigen GAPDH-Kontrolle der Quotient gebildet. Die mRNA-Mengen der gleichen mRNA verschiedener Untersuchungsproben können so direkt miteinander verglichen werden.

4.3.2.1 *Isolierung von Gesamt-RNA*

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma QIAGEN isoliert. Konfluent gewachsene NIH3T3-Zellen aus 3,5 cm-Zellkulturschalen wurden in im Kit enthaltenen Puffer lysiert. Die Homogenisierung des Lysates erfolgte durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge durch die Membran einer QIAshredder-Säule. Zur Fällung der RNA wurde dem Homogenisat ein Volumen an 70 %igem Ethanol hinzugefügt. Die Lösung wurde auf eine RNeasy Mini-Säule pipettiert. Zur Bindung der RNA an die Säulenmembran erfolgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Die an die Säulenmatrix gebundenen Nukleinsäuren wurden mit im Kit enthaltenem Puffer gewaschen. Zum Entfernen möglicher DNA-Reste wurde an der Membran ein DNA-Verdau mit Hilfe des RNase-free DNase Sets der Firma QIAGEN durchgeführt. Dazu wurden 10 µl DNase I-Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt. Die Lösung wurde auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die RNA mit im Kit enthaltenem Puffer gewaschen. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und 1 min bei 10.000 Upm eluiert. Die Qualität der isolierten RNA wurde auf einem Formaldehyd-Agarosegel überprüft.

4.3.2.2 *Bestimmung der RNA-Konzentration*

Die RNA-Quantität wurde photometrisch ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \times c \times d$) ist es möglich, die Konzentration einer

Nukleinsäurelösung bei bekanntem Extinktionskoeffizienten photometrisch zu bestimmen (Diehl et al., 1981). Bestimmung des RNA-Gehaltes: $A_{260 \text{ nm}} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$.

4.3.2.3 Reverse-Transkription (RT)

mRNA wird unter Verwendung eines Enzyms, der Reversen Transkriptase (RTase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die eingesetzte RTase besitzt neben ihrer Polymeraseaktivität auch eine Ribonuklease-H-Aktivität. Diese Ribonuklease degradiert spezifisch RNA aus RNA-DNA-Hybriden und führt so zu einer gesteigerten Sensitivität in der nachfolgenden PCR. Für die DNA-Synthese sind Primer erforderlich, an denen die Synthese in 5' → 3'-Richtung beginnen kann. *In-vivo* wird dieser Primer durch eine tRNA gebildet. *In-vitro* werden künstlich synthetisierte Oligo(dT)- als auch *random*-Primer verwendet. Die Oligo(dT)-Primer binden an die poly(A)-Sequenz, die sich am 3'-Ende der meisten mRNAs befindet.

Durchführung:

Die aus NIH3T3-Zellen isolierte RNA stellte das Ausgangsmaterial für die Reverse Transkription dar.

Für die Reverse Transkription wurde ein Mastermix aus dNTP-Mix , Oligo(dT)-Primer, *random* Primer, RNase-Inhibitor, Omniscript Reverse Transkriptase, RT-Puffer und RNase-freiem Wasser (minus RNA-Template-Volumen) hergestellt. Die Endkonzentrationen im 20 µl-Einfachansatz betragen 0,5 mM je dNTP, 1µM Oligo(dT)-Primer, 1,25 µM Random Primer, 10 Units RNase-Inhibitor bzw. 4 Units Omniscript Reverse Transkriptase in 1 x- RT-Puffer. Als Template wurde jeweils 1 µg RNA/Ansatz eingesetzt. Zur Denaturierung möglicher doppelsträngiger Bereiche wurden RNA und Primer vorher kurz bei 65 °C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Reverse Transkription erfolgte bei der optimalen Arbeitstemperatur der RTase von 37°C für 1 h. Die Proben wurden dann für 5 min auf 95 °C erhitzt, um das Enzym zu deaktivieren und anschließend auf Eis gestellt. Die cDNA wurde in die folgende PCR eingesetzt.

4.3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine Methode dar, mit der spezifische DNA-Sequenzen aus einem heterogenen Gemisch von DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert werden können. Das Reaktionsprinzip entspricht weitgehend der zellulären DNA-Replikation. Anstelle der hitzeempfindlichen DNA-Polymerase wird hierbei eine thermostabile Variante eingesetzt. Aus flankierenden Bereichen der Zielsequenz abgeleitete künstlich synthetisierte Oligonukleotidstränge fungieren als Primer und rahmen das zu amplifizierende Fragment ein. Pro PCR-Zyklus werden drei verschiedene Temperaturen durchlaufen:

- DNA-Denaturierung (Doppelstrangtrennung): 93 – 95 °C
- Annealing (Hybridisieren der spezifischen Primerpaare mit der komplementären Basen der DNA-Einzelstränge): Die Temperatur wird immer primerspezifisch gewählt und sollte etwa 10 °C unter der Schmelztemperatur des Primers liegen.
- DNA-Synthese: Die Temperatur entspricht der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten DNA-Polymerase.

Durchführung:

Es wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Dabei darf bei der Amplifikation der DNA der Sättigungsbereich nicht erreicht werden. Innerhalb dieses Bereiches steigt die Anzahl der Amplikons nicht mehr proportional zur eingesetzten Menge der Templates an, so dass keine Rückschlüsse mehr auf die cDNA-Ausgangskonzentration möglich sind.

Für jedes Primerpaar wurde ein Mastermix aus dNTPs, Sense- und Antisense-Primer, Taq-Polymerase-Puffer, Taq-Polymerase sowie sterilem Wasser (minus DNA-Template-Volumen) hergestellt. Die Endkonzentrationen im 50 µl-PCR-Ansatz betragen je Primer 300 nM, je dNTP 250 µM und 2 Units Taq-Polymerase in 1 x Taq-Polymerase-Puffer. Je 40 µl des entsprechenden Mastermix wurden mit 10 µl cDNA-Lösung aus der Reversen Transkriptions-Reaktion gemischt. Für die Negativkontrolle wurden statt des DNA-Templates 10 µl steriles Wasser, für die Positivkontrolle 40 ng/10 µl RhoB-DNA-Template eingesetzt. Zur Überprüfung einer potentiellen DNA-Kontamination der RNA

wurden je 1 µg RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser in die PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Initiale DNA-Denaturierung: 4 min bei 94 °C

30 Zyklen:

DNA-Denaturierung: 30 s bei 94 °C

Annealing: 2 min bei 55 °C

DNA-Synthese: 1 min 68 °C

Anschließend erfolgte eine Endverlängerung aller begonnener DNA-Stränge: 7 min bei 72 °C. Die Proben wurden dann bei 4 °C weiter inkubiert oder 10 min auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu verhindern.

4.3.2.5 *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Elektrophorese stellt ein biochemisches Trennverfahren dar, bei dem das unterschiedliche Wanderungsverhalten von geladenen Molekülen im elektrischen Feld ausgenutzt wird. Als elektrisch neutrale, feste Gelmatrix wird Agarose verwendet. Mit Agarosegelen können Fragmente zwischen 0,1 – 60 kb aufgetrennt werden. Nukleinsäuren wandern aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrats zur Anode und werden dabei nach ihrer Größe nach aufgetrennt. Ethidiumbromid kann in die DNA interkalieren, so dass die Banden unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden können.

Durchführung:

Es wurden 1 %ige Agarosegele verwendet.

- Auftrennung von DNA-Fragmenten:

1 g Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlung unter 65 °C wurde die Lösung mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in die Gelkammer gegossen. Der Träger mit dem auspolymerisierten Gel wurde in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gesetzt. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt. Je 3 - 5 µl der PCR-Proben, bzw. 5 µl des DNA-Markers wurden mit 15 - 17 µl sterilem Wasser gemischt und mit je 5 µl 5 x DNA-Probenpuffer versetzt. Der Marker wurde zuvor 5 min auf 65 °C erhitzt. Die Proben wurden auf das Gel

aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 45 – 60 min bei einer Spannung von 90 Volt wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel auf dem Kodak-Imager-System exponiert. Das Ergebnis wurde dokumentiert und mit der Kodak-Imager-Software ausgewertet.

- Auftrennung von RNA-Fragmenten:

1 g Agarose wurde in 100 ml 1 x FAG-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlung unter 65 °C wurde der Lösung 1,8 ml 37 % Formaldehyd hinzugefügt. Mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen.

Der Träger mit dem auspolymerisierten Gel wurde in die mit 1 x FAG-Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gesetzt. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt. Je 3 µl der isolierten RNA wurden mit je 5 µl RNase-freiem Wasser sowie 2 µl 5 x RNA-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. 5 µl des zuvor 5 min auf 65 °C erhitzten DNA-Markers wurde mit 15 µl sterilem Wasser und 5 µl 5 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 45 - 60 min bei einer Spannung von 90 Volt wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel auf dem Kodak-Imager-System exponiert. Das Ergebnis wurde mittels Kodak-Imager dokumentiert.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion für Sequenzierung

Ansatz 1:

| | |
|--|------|
| 5 x Ready Reaction Premix Sequencing Buffer | 4 µl |
| RhoB- bzw. GAPDH-Sense-Primer (1,6 pmol/µl) | 2 µl |
| Template-cDNA aus der RhoB- bzw. GAPDH-PCR (150 ng/µl) | 2 µl |

Ansatz 2:

| | |
|--|------|
| 5 x Ready Reaction Premix Sequencing Buffer | 4 µl |
| RhoB- bzw. GAPDH-Antisense-Primer (1,6 pmol/µl) | 2 µl |
| Template-cDNA aus der RhoB- bzw. GAPDH-PCR (150 ng/µl) | 2 µl |

Die PCR erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

Initiale DNA-Denaturierung: 1 min bei 96 °C

30 Zyklen:

DNA-Denaturierung: 10 s bei 96 °C

Annealing: 5 s bei 50 °C

DNA-Synthese: 4 s bei 60 °C

Anschließend wurden die Proben bei 4 °C weiter inkubiert oder 10 min auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der Einzelstränge zu verhindern.

Die PCR-Produkte wurden in je ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA wurde gefällt. Dazu wurden jeweils 10 µl steriles Wasser, 5 µl 125 mM EDTA (pH 7,0), 60 µl 100 %iges EtOH und 2 µl Dextran Blau (10 mg/ml) zu dem PCR-Produkt hinzugefügt. Der Ansatz wurde jeweils gut gemischt und anschließend bei RT für 15 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm in der Eppendorfzentrifuge wurden die Pellets mit jeweils 250 µl 70 %igem EtOH gewaschen und erneut bei 13.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser gut resuspendiert. Die DNA wurde für 2 min bei 90 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu verhindern. Die gelöste DNA wurde in sterile 0,5 ml Reaktionsgefäße mit Septum überführt und mittels Kapillarsequenzierers „ABI PRISM 310 Genetic Analyser“ sequenziert. Die PCR-Produkte wurden jeweils von 5' → 3', bzw. von 3' → 5' sequenziert.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Substratspezifität und Dokumentation der zytotoxischen Wirkung von TcdB

5.1.1 RhoA, Rac1 und Cdc42 sind spezifische Substrate von TcdB

Die niedermolekularen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sind spezifische Substrate der Mono-Glucosyltransferase TcdB. Experimentell lässt sich dies zeigen, indem rekombinante Rho-/Ras-GTPasen mit TcdB in Anwesenheit von UDP- ^{14}C -Glucose umgesetzt werden. **Abb. 6** zeigt, dass die RhoA-, Rac1- sowie die Cdc42-GTPase mit ^{14}C -Glucose markiert wurden. Im Gegensatz dazu ist die H-Ras-GTPase kein Substrat für eine Glucosylierung durch TcdB.

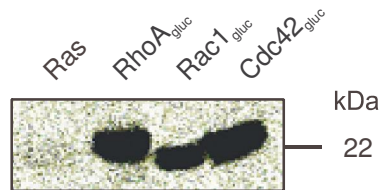


Abb. 6: Protein-Substratspezifität von TcdB. Rekombinantes RhoA, Rac1, Cdc42 bzw. Ras (jeweils 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde in Anwesenheit von UDP- ^{14}C -Glucose mit TcdB546 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 min bei 37°C inkubiert. Das Phosphorimager-Bild zeigt die ^{14}C glucosylierten Rho-Proteine.

5.1.2 Zytotoxische Wirkung von TcdB auf NIH3T3-Zellen

Die zytotoxische Wirkung von TcdB wurde an NIH-3T3-Zellen gezeigt. Initial kam es zur Retraktion des Zellkörpers, wobei die filamentöse Ausläufer (Retentionsfasern) vorerst erhalten blieben. Im weiteren Verlauf der Vergiftung kam es zur vollständigen Abrundung der Zellen mit Auflösung der Retentionsfasern und später zur Ablösung der Zellen von der Matrix. In **Abb. 7B** sind die geschrumpften Zellen sowohl mit als auch ohne Retentionsfasern gezeigt.

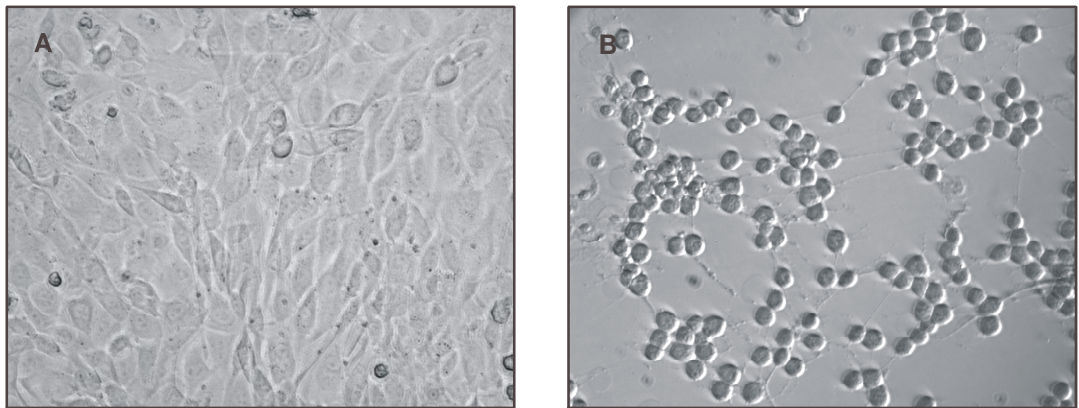


Abb. 7: Zytotoxische Wirkung von TcdB auf NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ TcdB für 1 h bei 37°C inkubiert. Phasenkontrastaufnahme von **A**: Kontrollzellen **B**: TcdB behandelten Zellen.

Die zytoskelettalen Veränderungen in der Zelle wurden durch die Fluoreszenzdarstellung des Aktinzytoskeletts mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin sichtbar gemacht [Abb. 8]. Zu erkennen sind die Aktinkabel, die unbehandelte Zellen durchspannen und ihre Morphologie bestimmen. Das Aktin lag in polymerisierter Form in dicken Bündeln vor. Nach der Vergiftung der Zellen mit TcdB kam es zur Depolymerisation des F-Aktins. Die Spindelform der Zelle wurde nicht mehr aufrechterhalten, die Zellen rundeten ab.

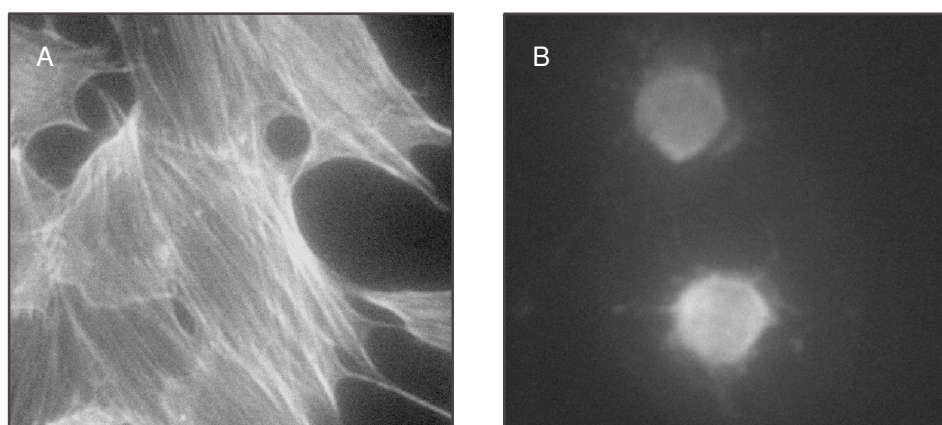


Abb. 8: Zytotoxische Wirkung von TcdB auf das Zytoskelett von NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit TcdB (200 ng/ml) 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Aktinzytoskelett wurde mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin angefärbt. Fluoreszenzaufnahme von **A**: Kontrollzellen **B**: TcdB behandelten Zellen.

5.2 Einfluss von TcdB auf den Proteinspiegel von Rac1

Für eine Beteiligung der glycosylierten Rho-Proteine an der zytotoxischen Wirkung von TcdB ist ihre Stabilität von entscheidender Bedeutung. Die intrazelluläre Proteinkonzentration der einzelnen glycosylierten Rho-Proteine nach der Applikation von TcdB wurde in NIH3T3-Zellen untersucht.

NIH3T3-Zellen wurden nach ihrer charakteristischen Abrundung direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen, um eine potentielle Degradation der Proteine durch die Aktivierung von Proteasen bei der Lyse der Zellen zu unterbinden. Die intrazellulären Proteinspiegel von RhoA, Rac1, Cdc42 und RhoB wurden mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Während unmodifiziertes und glycosyliertes RhoA und Cdc42 vergleichbare intrazelluläre Proteinspiegel zeigten, wurde lediglich unmodifiziertes Rac1 nachgewiesen. Dagegen war nach der TcdB-Applikation auf die Zellen eine starke Zunahme an RhoB-Protein zu beobachten [Abb. 9].

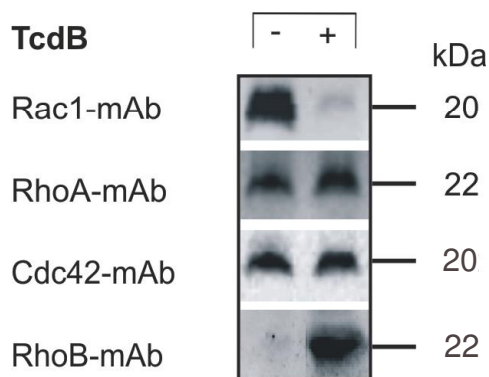


Abb. 9: Detektion der GTPasen Rac1, RhoA, RhoB und Cdc42 nach Glucosylierung durch TcdB *in vivo*. NIH3T3-Zellen wurden mit TcdB (200 ng/ml) 3 h bei 37 °C inkubiert. Der Western Blot zeigt die Detektion von Rac1, RhoA, RhoB und Cdc42 aus dem Zell-Lysat.

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper

5.2.1 *In vitro*-Nachweis von glucosyliertem RhoA und Rac1

Rac1 und RhoA unterliegen einer Proteasom-abhängigen Degradation (Lanning et al. 2004). Der fehlende Nachweis von glucosyliertem Rac1 könnte demnach auf eine intrazelluläre Degradation zurückzuführen sein. In diesem Fall sollte der Einsatz des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin die Degradation von glucosyliertem Rac1 hemmen und den Nachweis von glucosyliertem Rac1 erlauben. Eine unterbundene Protein-Antikörperbindung durch den Glucoserest am Thr-35 von Rac1 stellt eine weitere Möglichkeit dar, den fehlenden Nachweis von glucosyliertem Rac1 zu erklären. Zur Untersuchung dieser Möglichkeiten wurde GST-markiertes Rac1 dem Lysat von NIH3T3-Zellen zugesetzt und durch TcdB in Anwesenheit von UDP-[¹⁴C]-Glucose glucosyliert. Die Inkubation erfolgte mit bzw. ohne den Zusatz des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin. Der Einsatz von GST-markiertem Rac1 erlaubte den indirekten Nachweis von Rac1 mittels GST-mAb. Für einen vom Rac1-mAb unabhängigen direkten Nachweis von Rac1 wurde ein Rac1-pAb eingesetzt. Wie die **Abb. 10** zeigt, beeinflusste die Hemmung des S20 Proteasoms die Nachweisbarkeit von GST-markiertem Rac1 nicht. Der in den Experimenten eingesetzte Rac1-mAb reagierte mit unmodifiziertem, nicht aber mit dem glucosylierten Rac1. Dagegen wurde Rac1 unabhängig von seiner Modifikation durch TcdB mit Hilfe des GST-mAb und des Rac1-pAb nachgewiesen. Weiterhin wurde die Anwesenheit der GST-markierten [¹⁴C]glucosylierten Rac1-GTPase mittels PhosphorImager gezeigt.

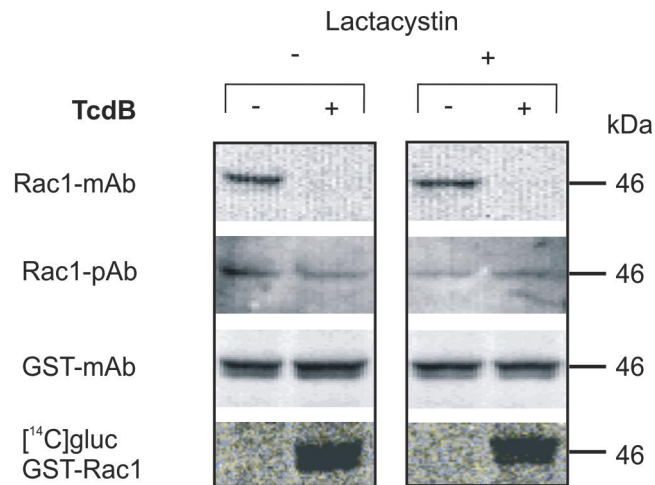


Abb. 10: Vergleich der Immunoblot-Darstellung von glucosyliertem GST-Rac1 mit der Phosphormager-Darstellung von [¹⁴C]glucosyliertem GST-Rac1. Dem Lysat von NIH3T3-Zellen wurde das Fusionsprotein GST-Rac1 (1 µg/ml) zugesetzt. Das Lysat wurde anschließend in Anwesenheit von UDP-[¹⁴C]-Glucose mit TcdB (10 ng/ml) +/- Lactacystin (30 µM) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Western Blot zeigt die Detektion von GST-Rac1 durch die aufgeführten Antikörper. Das Phosphormager-Bild zeigt das [¹⁴C]glucosylierte Protein.
mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper

Die fehlende Detektion von glucosyliertem Rac1 erklärte sich somit durch eine unterbundene Bindung des Rac1-mAb an das modifizierte Rac1. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um eine konzentrationsabhängige Hemmung dieser Bindung handelte, wurden unterschiedliche Konzentrationen an rekombinantem GST-Rac1 im lysatfreien System in Anwesenheit von UDP-[¹⁴C]-Glucose mit TcdB inkubiert. **Abb. 11A** zeigt die konzentrationsabhängige Detektion von glucosyliertem GST-Rac1 mittels Western Blot-Analyse. Das Phosphormager-Bild stellt das glucosylierte Protein dar. Die Signalintensitäten des nachgewiesenen GST-Rac1-Proteins wurden quantifiziert und als Diagramm dargestellt [**Abb. 11B bis G**]. Die Detektion von unmodifiziertem Rac1 nahm mit dem Rac1-mAb und mit dem Rac1-pAb etwa linear mit der GST-Rac1-Konzentration ab. Die Detektion von GST-Rac1 mittels GST-mAb nahm ebenfalls mit der GTPase-Konzentration ab. Diese Abnahme war jedoch aufgrund der gesättigten Signalintensitäten nicht mehr linear. Die Quantifizierung für glucosyliertes GST-Rac1 mit dem Rac1-pAb und dem GST-mAb zeigte eine ebensolche Kinetik wie für unmodifiziertes GST-Rac1.

Dagegen war die Erkennung von glucosyliertem GST-Rac1 durch den Rac1-mAb deutlich vermindert [**Abb. 11B und C**]. Vergleicht man den Nachweis von unmodifiziertem mit dem des glucosylierten GST-Rac1 durch den gleichen Antikörper, war die Erkennung von unmodifiziertem und glucosyliertem Rac1 durch den Rac1-pAb und GST-mAb nahezu gleich. Dagegen zeigte der Rac1-mAb eine stark verminderte Bindung an das glucosylierte im Vergleich zum unmodifizierten GST-Rac1 [**Abb. 11D bis F**].

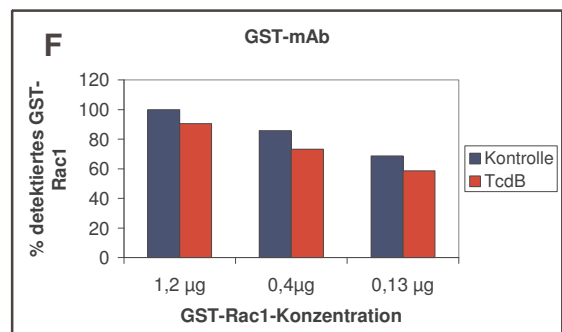
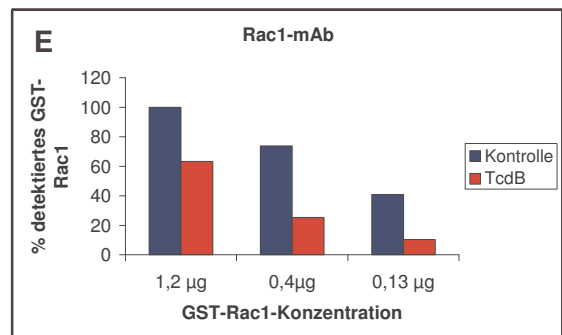
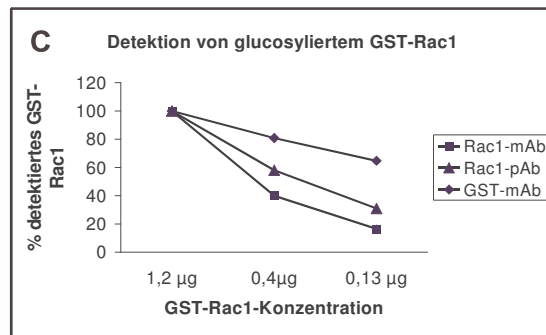
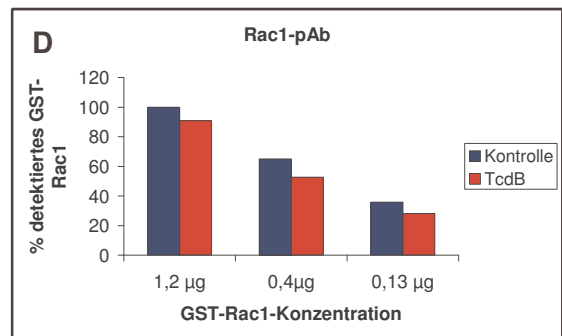
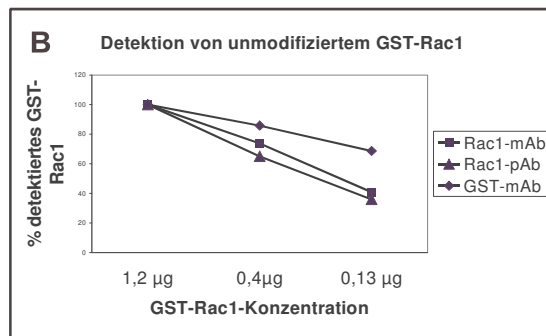
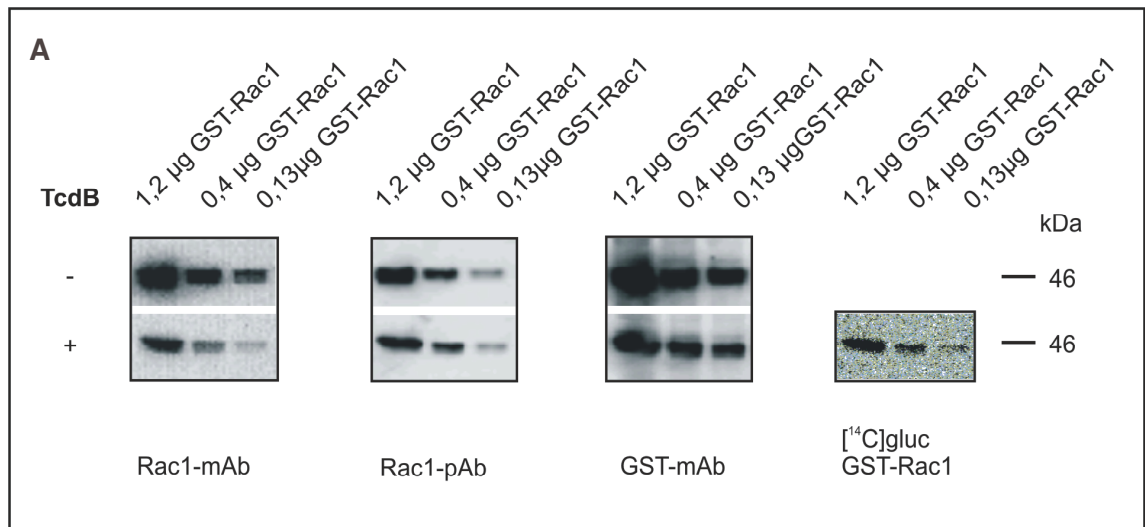


Abb. 11: Detektion von [¹⁴C]glucosyliertem GST-Rac1-Fusionsprotein in Abhängigkeit von der GST-Rac1-Proteinkonzentration. GST-Rac1 wurde in Anwesenheit von UDP-[¹⁴C]Glucose für 20 min bei 37 °C mit TcdB (40 µg/ml) inkubiert. **A:** Der Western Blot zeigt die Detektion von GST-Rac1 durch die aufgeführten Antikörper. Das Phosphorimager-Bild zeigt das [¹⁴C]glucosylierte Protein. Die Signale der Western Blot-Analyse wurden quantifiziert und konzentrationsabhängig dargestellt. **B und C:** Die jeweils höchste Konzentration an GST-Rac1 wurde auf 100 % gesetzt. Detektion von unmodifiziertem GST-Rac1 [**B**] Detektion von [¹⁴C]glucosyliertem GST-Rac1 [**C**]. **D bis F:** Der jeweilige Kontrollwert der höchsten GST-Rac1-Konzentration wurde auf 100 % gesetzt. Detektion durch Rac1-mAb [**D**], Rac1-pAb [**E**] und GST-mAb [**F**].

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper

Die Ergebnisse zeigen, dass die Glucosylierung von Rac1 die Bindung des Rac1-mAb hemmte. Diese Hemmung war abhängig von der Konzentration des Rac1-Proteins. Dabei wird deutlich, dass die Interaktion des Rac1-mAb mit dem glucosylierten Rac1 nicht durch zelluläre Bestandteile beeinflusst wurde. Anhand der Western Blot-Analyse ist weiterhin zu erkennen, dass der Rac1-pAb im Vergleich zum GST- und zum Rac1-mAb eine erheblich höhere Detektionsgrenze aufwies und für die Detektion von endogenem Rac1 nicht einzusetzen ist.

5.2.2 *In vivo*-Nachweis von glucosyliertem RhoA und Rac1

Glucosyliertes Rac1 konnte als GST-markiertes Fusionsprotein *in vitro* nachgewiesen werden. Untersuchungsergebnisse aus einem *in vitro*-System lassen sich jedoch nicht immer auf die Situation *in vivo* übertragen. Da der Rac1-pAb eine hohe Detektionsgrenze aufweist, sollte der indirekte Nachweis eines GFP-Fusionsproteins in der Zelle genutzt werden. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit fluoreszenz-markiertem Rac1 bzw. RhoA transient transfiziert. Durch das fluoreszierende Protein GFP ist es möglich, eine erfolgreiche Transfektion und die Expression des Proteins nachzuweisen. **Abb. 12** zeigt die erfolgreiche Transfektion der Zellen anhand des fluoreszierenden GFP-Rac1- bzw. GFP-RhoA-Proteins.

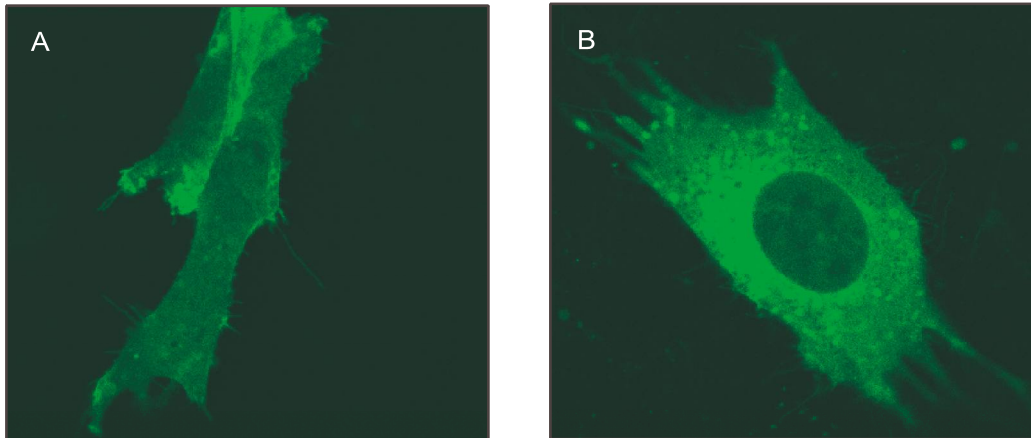


Abb. 12: Expression von GFP-Rac1 und GFP-RhoA in NIH3T3-Zellen. Fluoreszenzaufnahme von mit **A: pEGFP-Rac1** **B: pEGFP-RhoA** transient transfizierten NIH3T3-Zellen.

Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss mit TcdB vergiftet. Dabei wurde in mit pEGFP-Rac1 transfizierten Zellen zusätzlich die Proteasomen-abhängige Degradation von Proteinen durch Lactacystin gehemmt. Die Zellen wurden direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen, um eine potentielle Degradation der Proteine durch die Freisetzung von Proteasen bei der Lyse der Zellen zu unterbinden. Die intrazellulären Spiegel der glycosylierten und unmodifizierten GFP-markierten GTPasen Rac1 und RhoA wurden mittels Western Blot-Analyse dokumentiert. Wie im *in vitro*-System gezeigt, konnte sowohl unmodifiziertes Rac1 durch den Rac1-mAb als auch indirekt über den GFP-Teil des Fusionsproteins nachgewiesen werden, während glycosyliertes Rac1 durch den GFP-pAb und kaum durch den Rac1-mAb detektiert wurde [**Abb. 13A**]. Dagegen konnte sowohl glycosyliertes als auch unmodifiziertes RhoA gleichermaßen durch den RhoA-mAb und den GFP-pAb nachgewiesen werden [**Abb. 13B**]. Der Proteasomen-Inhibitor Lactacystin zeigte keinen Einfluss auf den Rac1-Nachweis.

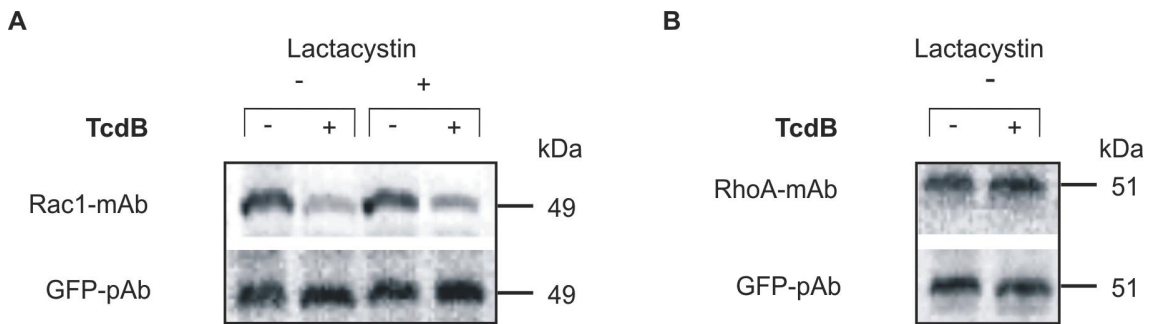


Abb. 13: Detektion des GFP-Rac1-, bzw. GFP-RhoA-Fusionsproteins nach Glucosylierung durch TcdB *in vivo*. NIH3T3-Zellen wurden transient mit pEGFP-Rac1, bzw. pEGFP-RhoA transfiziert und mit TcdB (200 ng/ml) +/- Lactacystin (30 μ M) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Western Blots zeigen die Detektion von **A**: GFP-Rac1 **B**: GFP-RhoA durch die aufgeführten Antikörper.

mAb = monoklonaler Antikörper; pAb = polyklonaler Antikörper

Die Glucosylierung von Rac1 durch TcdB führt demnach nicht zu einem raschen Abbau des modifizierten Proteins. Der fehlende Nachweis des glucosylierten Rac1-Proteins in der Western Blot-Analyse lässt sich auf eine fehlende Protein-Antikörperbindung zurückführen.

5.3 Einfluss von TcdB auf die Rho-GTPase RhoB

In NIH3T3-Zellen konnten jeweils für unmodifiziertes und glucosyliertes RhoA bzw. Cdc42 vergleichbare intrazelluläre Proteinspiegel nachgewiesen werden [Abb. 9]. Die fehlende Nachweisbarkeit von glucosyliertem Rac1 konnte durch die fehlende Protein-Antikörperbindung erklärt werden, die durch den Glucoserest verursacht wird. Durch den Einsatz anderer Antikörper zeigte sich auch hier ein vergleichbarer Proteinspiegel von unmodifiziertem und glucosyliertem Rac1 [Abb. 13A]. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Modifizierung durch TcdB keine destabilisierende Wirkung auf die Rho-Proteine besitzt.

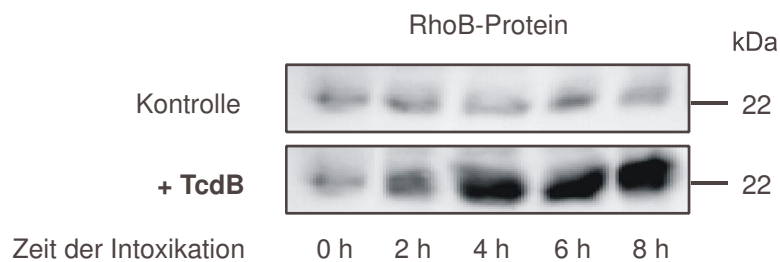
Die niedrige Proteinkonzentration von RhoB in unbehandelten NIH3T3-Zellen erhöhte sich durch Applikation von TcdB auf die Zellen stark [Abb. 9]. Es wäre möglich, dass diesem Anstieg der RhoB-Proteinkonzentration eine, auf der Glucosylierung basierende Stabilisierung des RhoB-Proteins zugrunde liegt.

Gleichzeitig wäre auch eine verstärkte Genexpression von *rhoB* denkbar, wie sie schon nach der Intoxikation von CaCo-2-Zellen mit TcdA gezeigt werden konnte (Gerhard et al. 2005).

5.3.1 TcdB-vermittelte Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der RhoB-Proteinzunahme

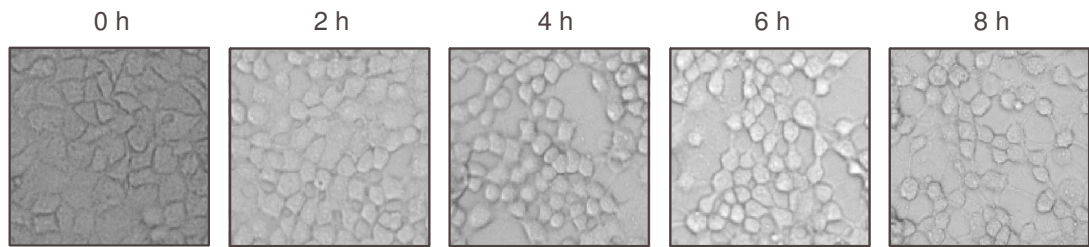
Um die Ergebnisse in einen Bezug zu den mit TcdA gewonnenen Daten stellen zu können, wurden die weiteren Untersuchungen an Caco-2-Zellen durchgeführt. Caco-2-Zellen wurden mit TcdB über einen Zeitraum von 8 h vergiftet. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aufgeschlossen und die Proteine mittels Western Blot analysiert. Der zytotoxische Effekt von TcdB auf die Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten dokumentiert. Wie die **Abb. 14A** zeigt, stieg die intrazelluläre RhoB-Proteinkonzentration in Caco-2-Zellen unter der Wirkung des TcdB zeitabhängig an. Dabei korrelierte der Anstieg des RhoB-Gehaltes mit der Toxin-vermittelten Abrundung der Zellen [**Abb. 14B**]. Die Zunahme des RhoB-Proteins über den Zeitraum von 8 h sowie die Kinetik der Zellabrundung wurden grafisch dargestellt [**Abb. 14C und D**].

A

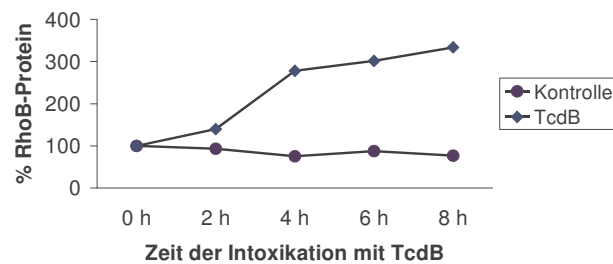


B

Zeit der Intoxikation von Caco-2-Zellen mit TcdB (800 ng/ml):



C

Anstieg der RhoB-Proteinkonzentration
nach Intoxikation mit TcdB (800ng/ml)

D

Zytotoxizität von TcdB

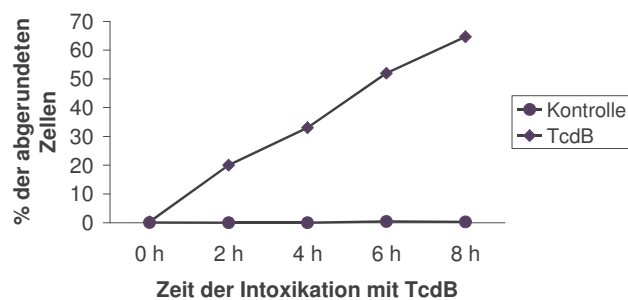
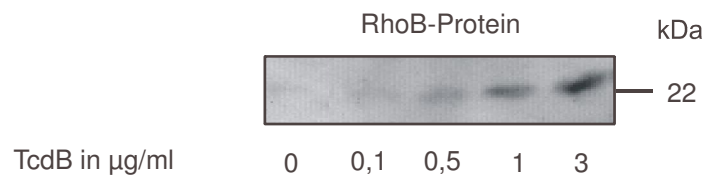


Abb. 14: Zeitabhängiger Anstieg der RhoB-Proteinkonzentration nach Intoxikation von Caco-2-Zellen mit TcdB. Caco-2-Zellen wurden bei 37 °C für die angegebenen Zeiten mit TcdB (800 ng/ml) inkubiert und anschließend lysiert. **A:** Der Western Blot zeigt die Detektion von RhoB zu den aufgeführten Zeiten. **B:** Phasenkontrastaufnahme der Kontrollzellen sowie der mit TcdB behandelten Zellen. **C:** Quantifizierung der Signalintensitäten des Western Blots. **D:** Quantifizierung der abgerundeten Zellen.

Um zu untersuchen, ob die Zunahme der RhoB-Proteinkonzentration nach Intoxikation der Zellen mit TcdB nicht nur zeit-, sondern auch konzentrationsabhängig war, wurden Caco-2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TcdB für 8 h vergiftet. Die **Abb. 15** zeigt den von der TcdB-Konzentration abhängigen Anstieg der intrazellulären RhoB-Proteinkonzentration. Es zeigte sich auch hier die Korrelation der RhoB-Zunahme mit den morphologischen Veränderungen der Zellen nach TcdB-Intoxikation. Dabei war der Anstieg der RhoB-Proteinkonzentration in der gezeigten Abbildung im Einklang mit der noch nicht abgeschlossenen Abrundung der Zellen nach 8 h deutlich geringer als in der Darstellung der Zeitabhängigkeit der TcdB-vermittelten RhoB-Proteinzunahme.

A**B**

8-stündige Intoxikation von Caco-2-Zellen mit TcdB in ng/ml:

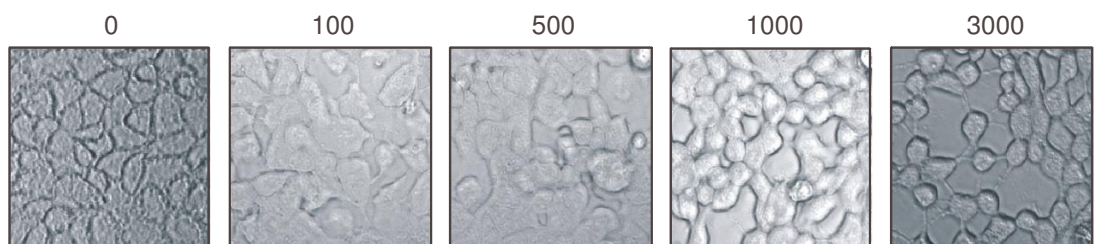


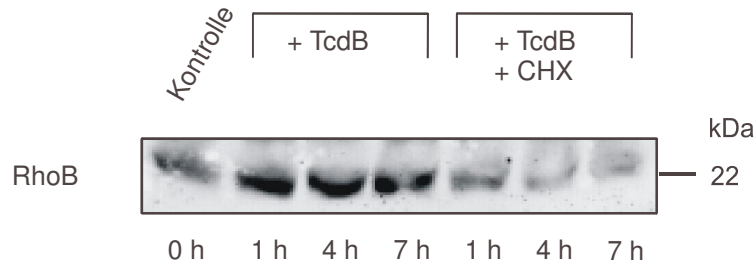
Abb. 15: Anstieg der RhoB-Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der TcdB-Konzentration in Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden für 8 h mit den aufgeführten TcdB-Konzentrationen inkubiert. **A:** Der Western Blot zeigt die Detektion von RhoB nach 8 h Intoxikation mit TcdB. **B:** Phasenkontrastaufnahme der Kontrollzellen sowie der mit TcdB behandelten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TcdB-vermittelte Zunahme der RhoB-Proteinkonzentration zeit- und konzentrationsabhängig ist. Dies konnte ebenfalls in NIH3T3-Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt).

5.3.2 Wirkung von TcdB auf die Stabilität von glucosyliertem RhoB

Es galt nun zu untersuchen, ob diese Zunahme durch eine Stabilisierung des glucosylierten RhoB-Proteins verursacht wurde. Dazu wurde die Halbwertszeit der glucosylierten GTPase mit Hilfe des Proteinbiosynthesehemmers Cycloheximid (CHX) ermittelt. Der geringe RhoB-Gehalt in unbehandelten Zellen wurde durch eine Vorinkubation von Caco-2-Zellen für 7 h mit TcdB erhöht. Anschließend wurden die Zellen mit CHX behandelt und über einen weiteren Zeitraum von bis zu 7 h inkubiert. Der Western Blot zeigt die Abnahme des RhoB-Proteingehaltes nach der Behandlung der Zellen mit CHX [**Abb. 16**]. Die Quantifizierung der Signalintensitäten zeigt eine ähnliche Halbwertszeit der glucosylierten RhoB-GTPase im Vergleich zur theoretischen Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von RhoB auf. Der Vergleich mit der theoretischen Halbwertszeit wurde aufgrund der geringen RhoB-Proteinkonzentration unbehandelter Zellen gewählt. Lebowitz et al. (1995) ermittelten für RhoB eine Halbwertszeit von 2 - 3 h. Daher wurde eine Halbwertszeit von 3 h angenommen. [**Abb. 16B**].

A



B

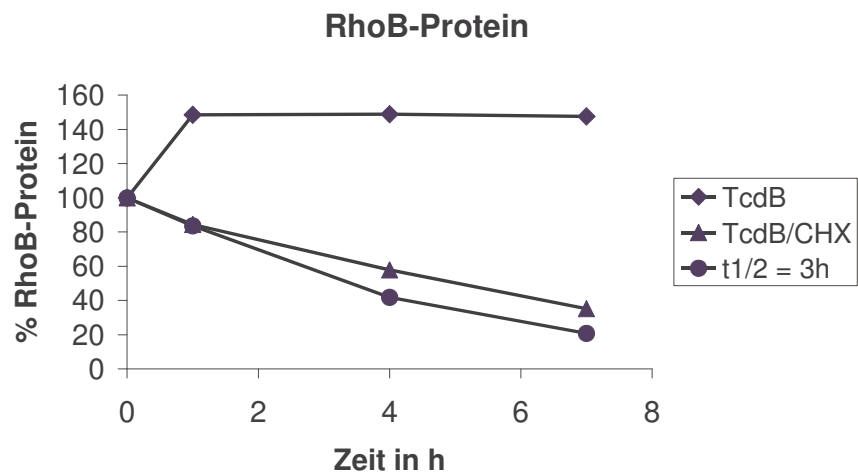


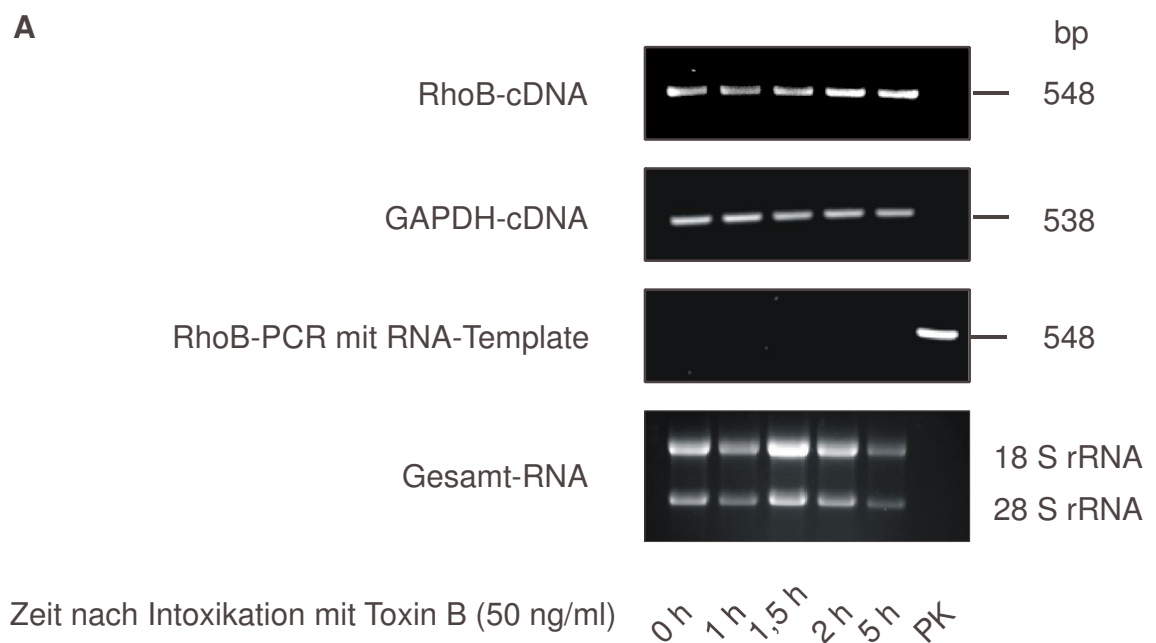
Abb. 16: Stabilität von glycosyliertem RhoB. Caco-2-Zellen wurden mit TcdB (1 $\mu\text{g/ml}$) 7 h bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend (= Zeitpunkt 0) wurden die Zellen nach Zugabe von CHX (25 μM) für die aufgeführten Zeiten bei 37 °C weiter inkubiert. RhoB wurde aus den Zellen extrahiert. **A:** Der Western Blot zeigt die Detektion von RhoB zu den aufgeführten Zeiten. **B:** Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Signalintensitäten aus dem Western Blot.

Der erhöhte RhoB-Proteinspiegel nach der Intoxikation der Zellen mit TcdB wurde demnach nicht durch eine Stabilisierung des glycosylierten RhoB-Proteins hervorgerufen.

5.3.3 Wirkung von TcdB auf den RhoB-mRNA-Gehalt der Zelle

Die Toxin-vermittelte Zunahme der RhoB-Proteinkonzentration könnte auf einer Wirkung von TcdB auf die Induktion der Transkription von *rhoB*, aber auch auf

einer Stabilisierung der RhoB-mRNA beruhen. Die Untersuchungen zur Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Toxin-vermittelten Zunahme der RhoB-Proteinkonzentration konnte auch in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da NIH3T3-Zellen sensibler für TcdB sind, wurden für die folgenden Experimente NIH3T3-Zellen eingesetzt. Zunächst wurde die Genexpression von *rhoB* nach der Intoxikation von NIH3T3-Zellen mit TcdB mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Die **Abb. 17** zeigt die RhoB- bzw. GAPDH-PCR-Produkte mit einer Länge von 548 bp bzw. 538 bp. Die cDNA-Produkte wurden als RhoB- bzw. GAPDH-cDNA verifiziert. Die in die RT-PCR eingesetzte RNA lag in hoher Reinheit und Qualität vor und wies keine DNA-Kontamination auf. Die Erfassung der amplifizierten cDNA des Haushaltsgens *gapdh* diente der Normierung der Ergebnisse. Wie die Grafik in **Abb. 17B** zeigt, kam es zu einer zeitabhängigen Zunahme des RhoB-cDNA-Gehaltes im Laufe der Vergiftung mit TcdB.



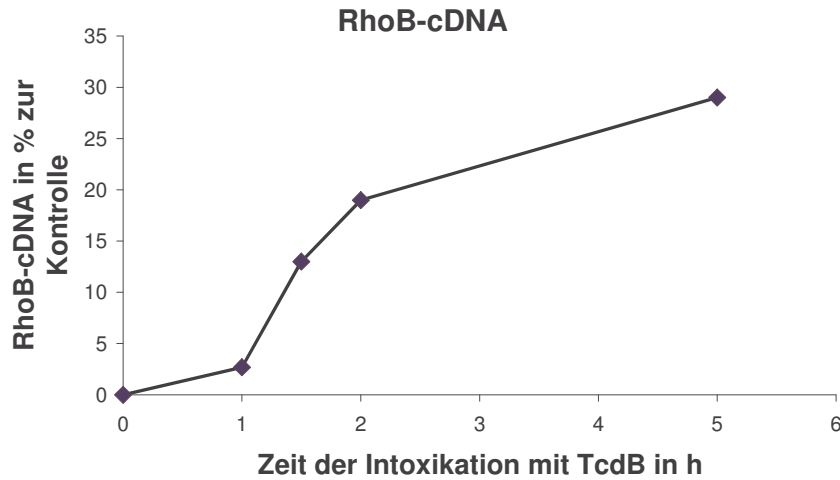
B**Abb. 17: Einfluss von TcdB auf den mRNA-Gehalt von RhoB nach Intoxikation von****NIH3T3-Zellen mit TcdB:** NIH3T3-Zellen wurden für die aufgeführten Zeiten bei 37 °C mitTcdB (50 ng/ml) inkubiert. Die RNA wurde isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. **A:** Die

Abbildung zeigt die cDNA-Spiegel von RhoB und GAPDH. Als Negativkontrolle wurde die RNA

in die PCR eingesetzt. Die Qualität der RNA wurde überprüft. **B:** Quantifizierung der normierten

RhoB-cDNA-Signalintensitäten.

PK = RhoB-Positivkontrolle

Um die Unterscheidung zu treffen, ob es sich um eine Induktion der *rhoB*-Transkription oder aber um eine Stabilisierung der RhoB-mRNA handelte, wurde die Gentranskription durch den Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Polymerase Actinomycin D verhindert. Die **Abb. 18A** zeigt den gleichbleibenden Gehalt an RhoB-cDNA aus Kontrollzellen. Dagegen konnte man nach Intoxikation der Zellen durch TcdB wiederum einen Anstieg des RhoB-cDNA-Gehaltes beobachten [**Abb. 18B**]. Nach der Applikation von Actinomycin D allein kam es zu einer deutlichen Abnahme des RhoB-cDNA-Gehaltes, die durch die Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und damit der *rhoB*-Transkription zu erklären ist. Dagegen kam es nach der Applikation von TcdB und Actinomycin D trotz Hemmung der *rhoB*-Transkription zu keiner deutlichen Abnahme des RhoB-cDNA-Gehaltes [**Abb. 18C**]. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet und graphisch dargestellt [**Abb. 18D**].

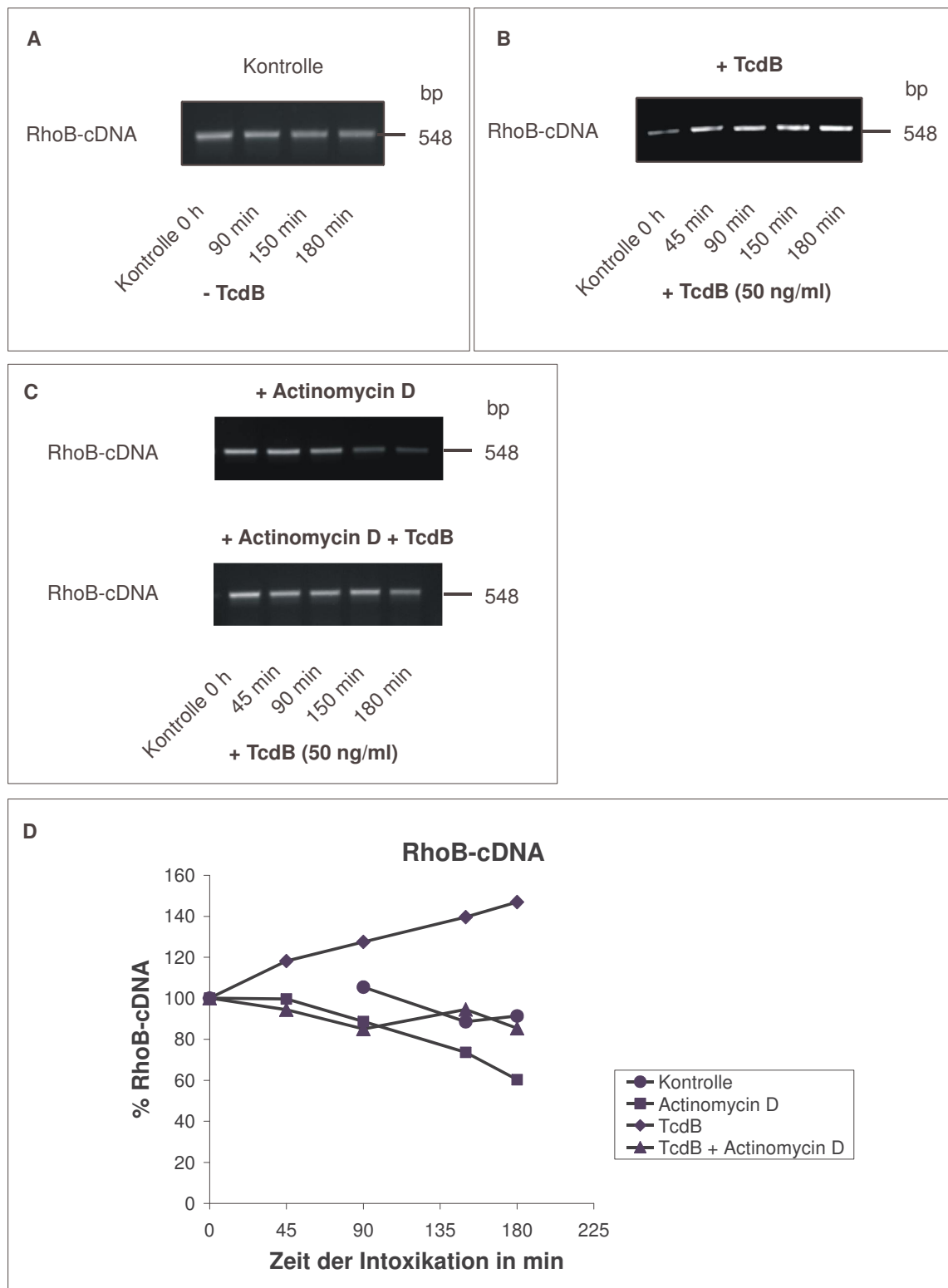


Abb. 18: Einfluss von TcdB auf die Stabilität der RhoB-mRNA in NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit TcdB (50 ng/ml), Actinomycin D (5 µg/ml) bzw. TcdB + Actinomycin D für die aufgeführten Zeiten inkubiert. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. RhoB-cDNA aus **A**: unbehandelten Zellen **B**: mit TcdB behandelten Zellen **C**: mit Actinomycin D +/- TcdB behandelten Zellen. **D**: Die Grafik zeigt die Quantifizierung der RhoB-cDNA-Signalintensitäten.

Die semiquantitative RT-PCR-Methode erlaubt einen Rückschluss vom cDNA-Spiegel auf den mRNA-Spiegel. Dementsprechend induziert TcdB nicht die *rhoB*-Transkription, sondern stabilisiert die RhoB-mRNA.

5.4 Lokalisation von unmodifizierten und glucosylierten Rho-Proteinen in der Zelle.

Eine wichtige Rolle in der Regulation der zytotoxischen Wirkung von TcdB könnte auch die Lokalisation der glucosylierten Rho-Proteine darstellen. Für Rho, Rac und Cdc42 wurde gezeigt, dass ihre regulatorische Rolle nicht nur vom Status ihrer Nukleotidbeladung, sondern auch von ihrer Lokalisation in der Zelle abhängig ist. Es sollte der Einfluss von TcdB auf die intrazelluläre Lokalisation der Rho-Proteine untersucht werden. Zunächst wurde eine Verschiebung des Membran-Zytosol-Gleichgewichts nach Glucosylierung der Rho-Proteine untersucht.

5.4.1 Die Zytosol-Membran-Verteilung der Rho-Proteine

Die Zytosol-Membran-Verteilung der Rho-Proteine wurde in Abhängigkeit von ihrer Nukleotidbeladung untersucht. Um die Rac1-GTPase nachweisen zu können, wurden NIH3T3-Zellen zunächst transient mit pEGFP-Rac1 transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Kernfraktion abgetrennt. Die Glucosylierung der GTPasen mit TcdB erfolgte *in vitro*, d.h. im Lysat. Der Nukleotidaustausch mit GDP bzw. GTP[γ S] erfolgte anschließend ebenfalls im Lysat. Der Western Blot in **Abb. 19** zeigt die Lokalisation der glucosylierten und unmodifizierten Rho-Proteine in Abhängigkeit ihrer Nukleotidbeladung. Unmodifiziertes GDP-gebundenes RhoA war in der Zytosolfraktion lokalisiert, während unmodifiziertes GDP-gebundenes Cdc42 und GFP-Rac1 zu einem Teil in der Zytosolfraktion und zum anderen Teil in der Membranfraktion vorlagen. Die unmodifizierten GTP[γ S]-gebundenen Rho-Proteine waren fast ausschließlich an die Membran transloziert, wo sie in der Zelle in ihrem aktiven Zustand ihrer regulatorischen Funktion nachkommen. Alle glucosylierten Rho-Proteine translozierten dagegen nukleotidunabhängig an die Membran. Die erfolgreiche

Zytosol-Membran-Fraktionierung wurde durch den Nachweis des ausschließlich zytosolisch lokalisierten Proteins GDI-1 in der Zytosolfraction dargestellt.

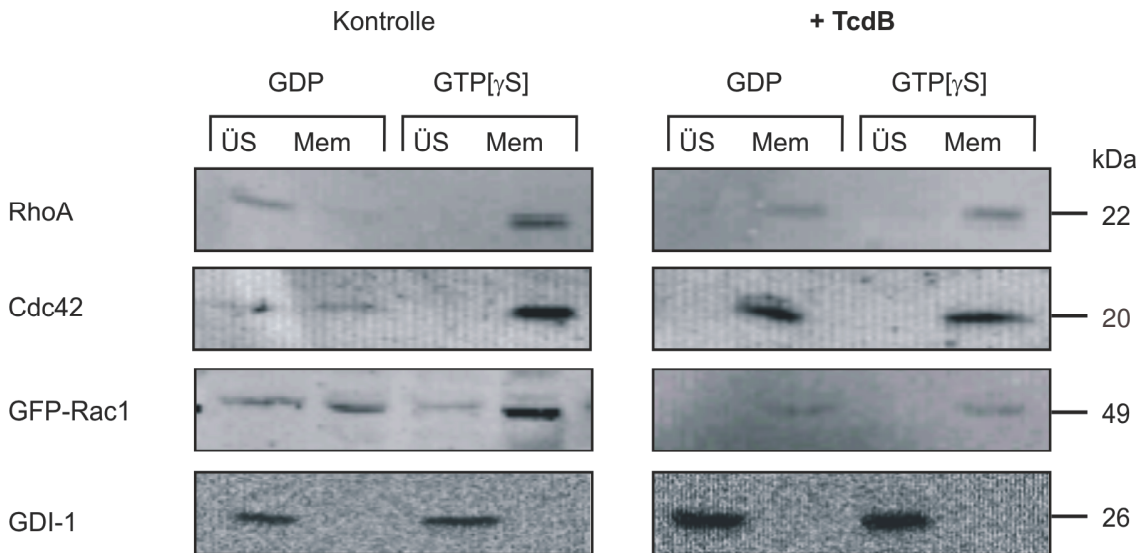


Abb. 19: Subzelluläre Verteilung der GTPasen RhoA, Cdc42 und GFP-Rac1 sowie GDI-1 in Abhängigkeit der Nukleotidbeladung und Glucosylierung durch TcdB. NIH3T3-Zellen wurden transient mit pEGFP-Rac1 transfiziert. Die Glucosylierung der Rho-Proteine durch TcdB und die Nukleotidaustauschreaktion erfolgte im Lysat. Der Western Blot zeigt die Detektion der GTPasen in den entsprechenden Fraktionen.

ÜS = Zytosolfraction; Mem = Membranfraction

Die Ergebnisse zeigen, dass es durch die TcdB-vermittelte Glucosylierung zu einer Verschiebung des Zytosol-Membran-Gleichgewichtes der Rho-Proteine in Richtung Membran kommt.

5.4.2 Die Lokalisation von Rho-Proteinen in der Membrandomäne Caveolae

Um zu untersuchen, ob die Glucosylierung der Rho-Proteine auch zu einer Verschiebung innerhalb von Membrankompartimenten führt, sollte zunächst ihre Verteilung zwischen Caveolae- und Nicht-Caveolae-Domäne untersucht werden. Hierzu wurden MDCK-Zellen aufgeschlossen und das Lysat mittels detergentienfreier Sucrose-Dichtezentrifugation aufgetrennt. Für diese Untersuchungen wurden MDCK-Zellen eingesetzt, da die Methode der

Isolierung der Caveolae mittels Sucrose-Dichtezentrifugation anhand von MDCK-Zellen etabliert wurde. Wie in **Abb. 20** gezeigt ist, liegen RhoA und Rac1 in den gleichen Fraktionen wie das Caveolae-Markerprotein Caveolin-1 vor. RhoA wurde zu einem geringen Teil, Rac1 zu einem vergleichbaren Teil ebenfalls in den Nicht-Caveolae-Fraktionen detektiert. Dagegen lag nur ein sehr geringer Teil des RhoB-Proteins zusammen mit Caveolin-1 vor. Der größte Anteil des RhoB-Proteins befand sich in den Fraktionen der höchsten Dichte, in der vor allem schwere Membranen und zytosolische Proteine vorliegen. Die RhoB-Proteinkonzentration ist in MDCK-Zellen höher als die in NIH3T3- und Caco-2-Zellen. RhoB konnte daher in diesem System aus unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. In den Fraktionen der höchsten Dichte, in der vor allem schwere Membranen und zytosolische Proteine vorliegen konnte auch das zytosolische Protein GDI-1 nachgewiesen werden.

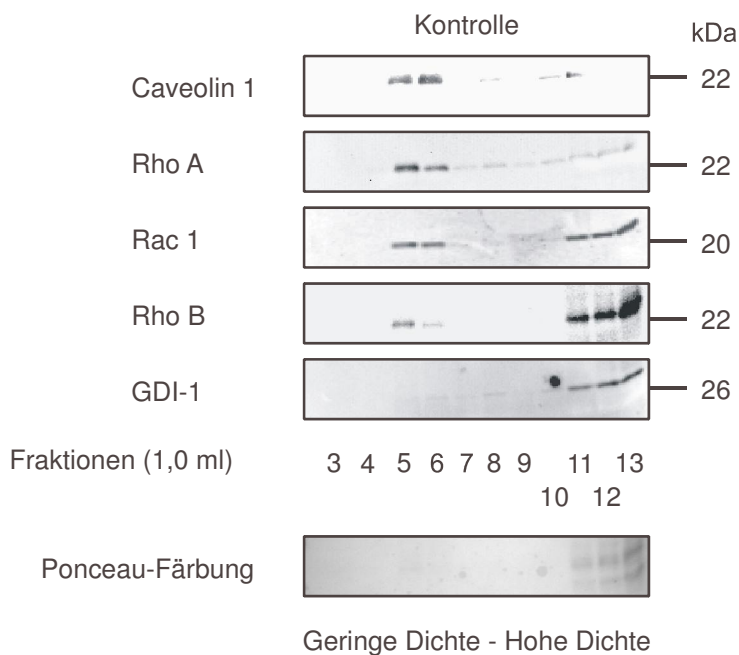


Abb. 20: Verteilung von RhoA, RhoB und Rac1 im Sucrosedichtegradient.: Lysate von MDCK-Zellen wurden mittels Sucrosetufengradient aufgetrennt und 1 ml-Fractionen wurden gewonnen. Der Western Blot zeigt die Detektion der aufgeführten Proteine in den einzelnen Fraktionen. Die Ponceau-Färbung zeigt die Verteilung des Gesamtproteins in den Fraktionen.

5.4.2.1 Der Einfluss der Glucosylierung auf die Verteilung von RhoA innerhalb des Membrankompartiments

Um den Einfluss der Glucosylierung auf die Verteilung von RhoA zwischen Caveolae und Nicht-Caveolae zu untersuchen, wurden MDCK-Zellen bis zur charakteristischen Abrundung der Zellen mit TcdB vergiftet [**Abb. 21**].

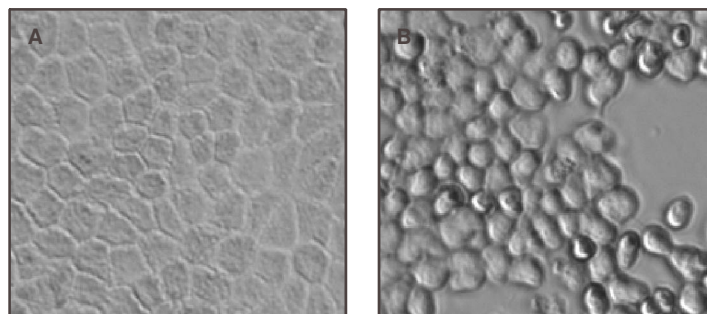


Abb. 21: Zytotoxische Wirkung von TcdB auf MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit TcdB (2 µg/ml) 8 h bei 37 °C inkubiert. **A:** Kontrollzellen **B:** TcdB-behandelte Zellen.

Die Zellen wurden aufgeschlossen und nur die Membranfraktionen mit Hilfe der Sucrose-Dichtgradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Dabei wurden die Membranen über einen Sucrose-Dichtgradienten von nur 6 ml Lösung aufgetrennt. Die **Abb. 22** zeigt die Kofraktionierung von RhoA und Caveolin-1 sowohl aus der Membranfraktion der Kontrollzellen als auch aus der Membranfraktion der mit TcdB inkubierten Zellen. Dabei lagen RhoA und Caveolin-1 in den Caveolae-Fractionen vor. Die Glucosylierung von RhoA durch TcdB nimmt demnach keinen Einfluss auf die Kolo-kalisation von Caveolin-1 und RhoA.

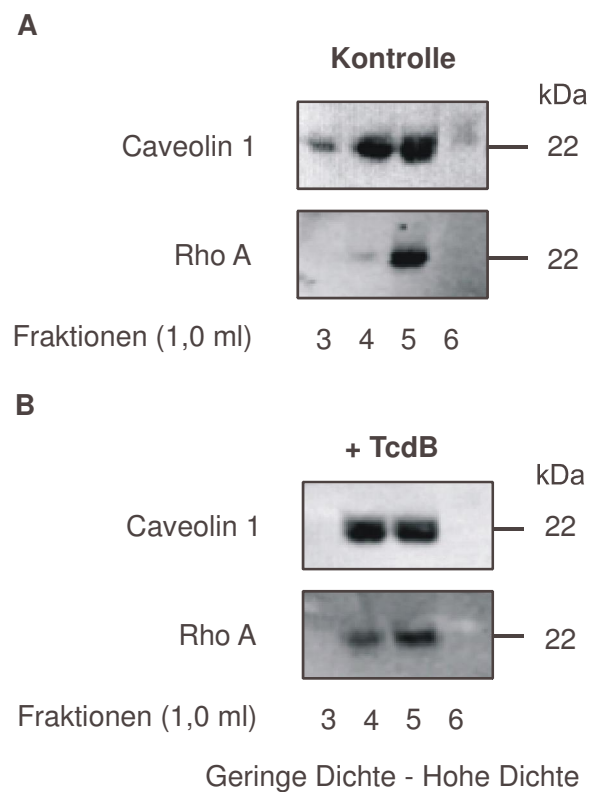


Abb. 22: Verteilung von membrangebundenem RhoA im Sucroседichtegradient.: Membranen von mit TcdB (2 µg/ml) vergifteten MDCK-Zellen wurden mittels Sucroседstufengradient aufgetrennt und 1 ml-Fraktionen wurden gewonnen. Der Western Blot zeigt die Detektion der aufgeführten Proteine in den einzelnen Fraktionen. **A:** Kontrolle **B:** TcdB-behandelte Zellen.

6 Diskussion

Der Wirkmechanismus der großen clostridialen Zytotoxine verläuft über die Glucosylierung spezifischer niedermolekularer GTPasen der Ras-Superfamilie. Zu den großen clostridialen Zytotoxinen zählt auch das *C. difficile* Toxin B (TcdB). Die zytotoxische Wirkung von TcdB wird über die Glucosylierung seiner Substrate Rho, Rac und Cdc42 vermittelt, die zu den Mitgliedern der Rho-GTPasen, einer Unterfamilie der Ras-Superfamilie gehören. Die Rho-GTPasen sind insbesondere in die Regulation des Aktinzytoskeletts involviert, spielen aber auch in der Regulation des Zellzyklus, der Gentranskription und der unspezifischen Immunabwehr eine Rolle. Ihre Glucosylierung führt zur Hemmung der Effektorkopplung und damit zur Blockade der nachgeschalteten Signaltransduktion (Just et al. 2004). Zusätzlich kommt es durch die Glucosylierung zur Modulation der intrazellulären Lokalisation und zu einem Einfluss auf die Stabilität der modifizierten, inaktivierten Rho-Proteine (Dillon et al. 1995, Genth et al. 1999).

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zu einem detaillierteren Verständnis der zellulären Auswirkungen der Glucosylierung. Durch dieses ist es möglich, auch weitere Kenntnisse über die Rho-Signaltransduktion zu erhalten. Die Arbeit beschreibt die Wirkung der TcdB-vermittelten Glucosylierung auf die Stabilität von Rac1 und RhoB sowie den Einfluss der Glucosylierung auf die intrazelluläre Lokalisation von RhoA.

6.1 Einfluss von TcdB auf die Stabilität des Rac1-Proteins

In der TcdB-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist eine Rolle für das durch TcdB glucosylierte RhoA bereits nachgewiesen. So kommt es nach der Mikroinjektion des modifizierten RhoA in kultivierte Zellen zu den gleichen morphologischen Veränderungen wie nach extrazellulärer Applikation von TcdB auf die entsprechenden Zellen (Just et al. 1995a). Beobachtungen, die eine schnelle Degradation des glucosylierten Rac1 zeigen (Clerk et al. 2001), stellen

eine Funktion des glucosylierten Rac1 in der Toxin-vermittelten Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Frage. Demgegenüber schlagen Boquet et al. (2003) vor, dass die wichtigsten Wirkungen der Toxine durch Rac1 vermittelt werden, da es das einzige gemeinsame Substrat aller großen clostridialen Zytotoxine darstellt. Der Einfluss von TcdB auf die Stabilität von Rac1 wurde daher genauer untersucht.

Nach der Glucosylierung von Rac1 mit TcdB konnte das modifizierte Rac1 mit Hilfe der Western Blot-Analyse nicht mehr nachgewiesen werden. Die gleiche Beobachtung wurde von Clerk et al. (2001), Hahn et al. (2002) und Chaves-Olarte et al. (2003) beschrieben. Der fehlende Nachweis von glucosyliertem Rac1 in der Western Blot-Analyse führte zu der Annahme, dass dieses degradiert würde. Die Annahme wurde durch die Befunde gestützt, dass auch andere Modifikationen zur Degradation von Rac1 führen. So werden durch CNF-1 deamidierte Rho-Proteine proteasomal degradiert. Lerm et al. (2002) zeigten dabei die Degradation von deamidiertem Rac1, nicht aber von deamidiertem RhoA und Cdc42 während Doye et al. (2002) eine Degradation aller drei Rho-Proteine beobachteten. Von diesen wurde für modifiziertes Rac1 die größte Sensitivität für die Ubiquitylierung und damit den proteasomalen Abbau beobachtet.

Es konnte jedoch auch nach der Hemmung der Proteasomen-vermittelten Proteindegradation durch den Einsatz des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin weder *in vitro* noch *in vivo* glucosyliertes Rac1 mit Hilfe des einzigen kommerziell erhältlichen Rac1-mAb im Western Blot detektiert werden. Dagegen konnte mit [¹⁴C]-Glucose markiertes glucosyliertes Rac1 mittels Phosphorimager nachgewiesen werden. Eine Degradation des modifizierten Proteins schien daher nicht wahrscheinlich. Der Widerspruch ließ sich durch weitere Untersuchungen lösen. Der Einsatz von GST- bzw. GFP-markiertem Rac1 und eines Rac1-pAb, GST-mAb sowie eines GFP-pAb ermöglichte eine Rac1-mAb-unabhängige Detektion des glucosylierten Proteins. So wurde im Gegensatz zu dem bislang eingesetzten handelsüblichen Rac1-mAb sowohl *in vitro* glucosyliertes GST-Rac1 als auch *in vivo* glucosyliertes GFP-Rac1 durch den Rac1-pAb sowie durch den GST-mAb bzw. GFP-pAb nachgewiesen.

Dieser Befund ist vereinbar mit den Beobachtungen von Clerk et al. (2001), Hahn et al. (2002) und Chaves-Olarte et al. (2003), die lediglich den einzigen handelsüblich verfügbaren Rac1-mAb von Transduction Laboratories einsetzten und mit diesem das glycosylierte Rac1 nicht nachweisen konnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Abnahme des Rac1_{gluc}-Signals in der Western Blot-Analyse auf die Hemmung der Antikörper-Rac1_{gluc}-Bindung zurückzuführen ist. Sie lassen auf ein stabiles glycosyliertes Rac1-Protein schließen, welches aufgrund der gehemmten Antikörper-Proteinbindung nicht zu detektieren ist. Dennoch kann eine partielle Degradation von glycosyliertem endogenem Rac1 in diesen Untersuchungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da die Stabilität des nachgewiesenen markierten Rac1-Proteins durch die N-terminale Markierung mit GST oder GFP erhöht sein könnte. Dillon et al. (1995) zeigten eine erhöhte Stabilität für Myc-markiertes RhoA. Lanning et al. (2004) konnten dies für HA-markiertes RhoA zeigen, allerdings nicht für HA-markiertes Rac1.

Obwohl diese Möglichkeit besteht, werden die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse durch die Beobachtungen von Dillon et al. (1995) unterstützt, die durch Verwendung eines selbst hergestellten monoklonalen Rac1-Antikörpers glycosyliertes endogenes Rac1 nachwies. Auch die folgenden Befunde von Lanning et al. (2004) unterstützen die Annahme eines stabilen glycosylierten Rac1-Proteins:

Rho-Proteine besitzen zusätzlich zur sogenannten Destruction-Box (D-box) in ihrer polybasischen Domäne eine konservierte nukleäre Lokalisationssequenz (NLS). Es konnte gezeigt werden, dass Rac1 in den Nukleus transloziert, wo es ubiquitinyliert und degradiert wird, während RhoA im Zytosol degradiert wird. Eine Chimäre von Rac1 mit der polybasischen Domäne von RhoA verblieb im Zytosol, woraufhin die proteosomale Degradation von Rac1 aufgrund eines veränderten Degradationsmechanismus verzögert vonstatten ging. Sollte glycosyliertes Rac1 nach dem in Kapitel 1.2.3.1 beschriebenen Modell inaktiv an der Plasmamembran sequestriert werden, so sollte dies eher zu einer verzögerten als zu einer beschleunigten Degradation der modifizierten GTPase führen.

Geht man daher von der Stabilität des glucosylierten Rac1-Proteins aus, so ist eine Relevanz dieses Proteins in der TcdB-vermittelten Wirkung auf kultivierte Zellen durchaus gegeben. Es könnte, wie für glucosyliertes RhoA gezeigt (Just et al. 1995a), eine biologisch aktive Funktion ausüben, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts nach der Intoxikation von Zellen mit TcdB beteiligt ist. Die Beobachtung, dass es nach der Intoxikation von kultivierten Zellen mit einer Variante des TcdB, dem TcdB₁₄₇₀ und dem großen clostridialen Zytotoxin „Letales Toxin“ von *C. sordellii* zur Depolymerisierung der Aktinfasern kommt, obwohl diese beiden Glucosyltransferasen den eigentlichen Regulator der Aktinfaserbildung RhoA nicht modifizieren, könnte einen Hinweis auf eine indirekte Beteiligung von glucosyliertem Rac1 an der Depolymerisation der Aktinkabel bedeuten.

6.2 Einfluss von TcdB auf das RhoB-Protein

Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glucosylierung der Rho-Proteine durch TcdB ihre Stabilität nicht negativ beeinflusst. Die initialen Untersuchungen zeigten sogar, dass sich die in unbehandelten NIH3T3-Zellen geringe Proteinkonzentration von RhoB nach der Applikation von TcdB auf die Zellen stark erhöhte. Dieser Effekt von TcdB war sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Das nahe verwandte *C. difficile* Toxin A (TcdA) übt diese Wirkung in Caco-2-Zellen aus (Gerhard et al. 2005).

Die Tatsache, dass RhoB nur eine Halbwertszeit von ca. 2 - 3 h besitzt (Lebowitz et al. 1995), führte zu der Annahme, dass es sich aufgrund einer Stabilisierung durch den Glucoserest um eine Akkumulation von glucosyliertem RhoB handelte. Mit Hilfe des Proteinbiosynthesehemmers Cycloheximid konnte jedoch gezeigt werden, dass der erhöhte RhoB-Proteinspiegel nicht auf der angenommenen Stabilisierung des glucosylierten Proteins basierte. Es kam weder zu einer Toxin-vermittelten Degradation noch zu einer Stabilisierung des RhoB-Proteins. Durch den Einsatz des Inhibitors der DNA-abhängigen RNA-Polymerase Actinomycin D konnte gezeigt werden, dass die erhöhte RhoB-

Proteinkonzentration auf einer Toxin-vermittelten Stabilisierung der RhoB-mRNA basiert.

Dieser Befund widerspricht nicht der Beobachtung von Gerhard et al. (2005), die mittels cDNA-Mikroarray nach der Intoxikation von Caco-2-Zellen mit TcdA einen erhöhten RhoB-mRNA-Spiegel im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachwiesen.

rhoB ist ein immediate-early-gene und wird konstitutiv sehr schwach exprimiert. Eine verstärkte Genexpression wurde nach genotoxischem Stress wie UV-Bestrahlung oder nach Behandlung von Zellen mit Alkylantien beobachtet (Fritz et al. 1995). Analog zu den hier gezeigten Ergebnissen wurde von Malcom et al. (2003) auch eine transiente Stabilisierung der RhoB-mRNA nach DNA-Schädigung beschrieben.

Das RhoB-Protein vermittelt den Übergang der geschädigten Zellen in die Apoptose (Fritz et al. 2000; Liu et al. 2001) und ist damit in eine Schutzfunktion der Zelle gegen Zellschädigungen involviert. Fritz and Kaina (2001) zeigten aber auch eine RhoB-vermittelte Inhibierung von NF κ B, welches eine zentrale Rolle in der Immunabwehr der Zelle spielt. Eine Vielzahl von Viren und Bakterien hemmen die NF κ B-Signalkaskade, um den Abwehrmechanismus der Zelle einzuschränken (Tato und Hunter 2002). Ein TcdB-vermittelter Anstieg der RhoB-Konzentration sollte somit ein Vorteil für das *C. difficile*-Bakterium darstellen. Die anschließende Inaktivierung von RhoB durch die TcdB-vermittelte Glucosylierung würde diesen Vorteil jedoch ins Gegenteil verwandeln und sich positiv auf die NF κ B-Signalkaskade und die Immunantwort der Zelle auswirken, was eher für eine transiente Wirkung spricht.

Interessanterweise konnten Gerhard et al. (2005) zeigen, dass das durch TcdA induzierte RhoB nur zum Teil glucosyliert wurde, während der andere Teil unmodifiziert vorlag und daher seine Funktion in der Signalübertragung weiterhin wahrnehmen sollte. Aufgrund der Tatsache, dass die hohe RhoB-Proteinkonzentration bis zu 24 h lang nachzuweisen ist, stellen sie folgende Hypothese auf: Glucosyliertes RhoB könnte einen dominanten Effekt vermitteln, der den selbstlimitierenden Rückkopplungsmechanismus des unmodifizierten RhoB-Proteins blockiert und so eine hohe RhoB-Proteinkonzentration und

langanhaltende Hemmung von NF κ B in der Zelle induziert. Diese könnte in eine eingeschränkte Immunantwort der Zellen münden.

Auf der anderen Seite ist es denkbar, dass der Anstieg der RhoB-Konzentration eine Gegenregulation der Zelle im Hinblick auf inaktives RhoB darstellt, wobei RhoB positiv in eine NF κ B-unabhängige, für die Zelle schützende Signalkaskade involviert ist. In jedem Fall konnte hier jedoch gezeigt werden, dass TcdB nicht lediglich einen hemmenden Einfluss auf die unmittelbare Funktion der GTPasen infolge der Effektorbindungsblockade ausübt, sondern auch die Regulation der Proteinkonzentration eines seiner Substrate moduliert.

6.3 Einfluss von TcdB auf die Lokalisation von Rho-Proteinen

Die vermeintliche Degradation von glucosyliertem Rac1 wurde als eine inhibierte Rac1_{gluc}-Rac1-mAb-Bindung dargestellt, die Ergebnisse lassen auf ein stabiles glucosyliertes Rac1 schließen. Glucosyliertes Rac1 wäre demnach ebenso fähig, an die Membran zu binden, wie glucosyliertes RhoA, welches dort vermutlich seinen dominant-negativen Effekt auf das Aktinzytoskelett ausübt (Just et al. 2004). In dieser Hinsicht ist die genaue Lokalisation der glucosylierten Rho-GTPasen von Interesse. Es gibt Hinweise, dass die Membranmikrodomäne Caveolae im Zusammenhang mit der Regulation der Rho-Proteine über den Zytosol-Membran-Zyklus die Plattform für die koordinierte Signalvermittlung der GTPasen darstellt und RhoA an der Regulation dieser Domäne beteiligt ist. Eine veränderte subzelluläre Lokalisation glucosylierter Rho-Proteine könnte eine Rolle bei der zytotoxischen Wirkung von TcdB spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch die Nukleotidbeladung gesteuerte Verteilung der Rho-Proteine zwischen Zytosol und Membran durch die Glucosylierung der Rho-Proteine aufgehoben wird. Vergleichbar mit der verstärkten Membranbindung von glucosyliertem RhoA (Genth et al. 1999) assoziierten auch glucosyliertes Rac1 sowie glucosyliertes Cdc42 unabhängig von ihrer Nukleotidbeladung mit der Membran.

Der Befund, dass die Rho-Proteine nach der Glucosylierung durch TcdB auch in GDP-gebundenem Zustand an die Membran binden, spricht für die Beteiligung des Glucoserestes an der Membranassoziation der modifizierten Rho-Proteine. Es wäre denkbar, dass der Glucoserest eine veränderte Lokalisation der modifizierten Rho-Proteine induziert, wodurch ein Verlust ihrer Funktion möglich ist, sie aber auch eine andere, biologisch aktive Funktion in der Zelle übernehmen könnten.

Wie hier dargestellt, lag glucosyliertes RhoA jedoch ebenso wie unmodifiziertes RhoA in der Caveolae-Domäne vor. Es kam nicht zu einer Verschiebung von glucosyliertem RhoA von der Caveolae- hin zur Nicht-Caveolae-Domäne, wie es von Michaely et al. (1999) nach der ADP-Ribosylierung von RhoA durch die *C. botulinum* C3-Transferase beobachtet wurde. Obwohl sowohl die Glucosylierung als auch die ADP-Ribosylierung von RhoA zur Inaktivierung der modifizierten GTPase führt, so scheinen die Konsequenzen im Hinblick auf die subzelluläre Verteilung unterschiedlich zu sein. Glucosyliertes, inaktives RhoA bindet demnach in der gleichen Membrandomäne wie unmodifiziertes RhoA und vermittelt dort vermutlich durch die dauerhafte Sequestrierung seiner putativen Bindungsstellen seinen dominant negativen Effekt. Die Überprüfung der Lokalisation des glucosylierten Rac1-Proteins konnte aufgrund der mangelnden Detektion des modifizierten Proteins nicht durchgeführt werden. Eine Übertragung des Befundes von RhoA auf Rac1 ist nicht möglich, da die Lokalisation innerhalb der Membrandomänen nicht zwangsläufig für alle Mitglieder einer Subfamilie die gleiche ist. So wurde gezeigt, dass die Mitglieder der Ras-Subfamilie H-Ras und K-Ras teilweise in der selben Membrandomäne lokalisiert vorliegen, sich diese Lokalisation jedoch in Abhängigkeit von der Nukleotidbeladung bei H-Ras hin zur Caveolae-Domäne verschiebt, wohingegen sich die Lokalisation von K-Ras durch seine Nukleotidbeladung nicht verändert (Prior et al. 2001).

Dennoch implizieren die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse, dass die Glucosylierung der Rho-Proteine zu einer Verschiebung des Zytosol-Membran-Gleichgewichts in Richtung Membran führt, wo die Proteine innerhalb

der Signalplattform Caveolae in inaktivem Zustand sequestriert werden und dort ihren Beitrag zur zytotoxischen Wirkung von TcdB leisten.

6.4 Ausblick

Bisher wurde die funktionelle Auswirkung der TcdB-vermittelten Glucosylierung der Rho-GTPasen durch die einfache Blockade der GTPase-Effektorkopplung erklärt. Dabei wurde ein Modell aufgestellt, wonach es basierend auf einer fehlenden Rho-GDI-1-Interaktion zu einer dauerhaften Sequestrierung der durch die Blockade der GTPase-Effektorkopplung inaktiven Rho-GTPasen an der Membran kommt (Kap. 1.2.3.1). Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verfeinert sich das Bild der zytotoxischen Wirkung von TcdB. Das beschriebene Modell wurde aufgrund von Untersuchungen an der Rho-GTPase RhoA aufgestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch glucosyliertes Rac1 in der Lage sein kann, an die Membran zu binden, um dort im inaktiven Zustand dauerhaft sequestriert zu werden und eine dominant-negative Wirkung auf das Aktinzytoskelett auszuüben. Dies impliziert der Nachweis des stabilen modifizierten Rac1-Proteins sowie die Nukleotidunabhängige Translokation von glucosyliertem Rac1 an die Membran. Ein direkter Nachweis wurde nicht erbracht. Mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik könnte jedoch eine differenzierte Aussage getroffen werden, welche Rolle glucosyliertes Rac1 bei der zytotoxischen Wirkung von TcdB spielt. Die Darstellung der vermeintlichen Degradation von glucosyliertem Rac1 als eine gehemmte Rac1-Antikörperbindung ist darüber hinaus ein wichtiges Ergebnis im Hinblick auf die bisherige Datenlage in Bezug auf das glucosylierte Rac1. Der kommerziell erhältliche Rac1-mAb wird für die Western Blot-Analyse in den meisten Laboren standardmäßig eingesetzt. Es kam daher in der Vergangenheit zu falschen Interpretationen im Hinblick auf die fehlende Nachweisbarkeit von glucosyliertem Rac1. Weiterhin könnte man sich die gehemmte Antikörperbindung zunutze machen, um die Glucosylierungsrate von Rac1 zu bestimmen. Dies könnte einen Ersatz für die bisherigen radioaktiven Glucosylierungsassays darstellen. Dazu muss jedoch jegliche Degradation von glucosyliertem Rac1 ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen das oben aufgeführte Modell weiterhin durch die aufgezeigte Lokalisation des glucosylierten, inaktivierten RhoA in der Membranmikrodomäne Caveolae, in der auch das unmodifizierte RhoA vorliegt (Michaely et al. 1999). Die Kenntnis der Lokalisation der glucosylierten Rho-GTPasen stellt einen wichtigen Schritt in die Richtung einer Identifizierung der Membranbindungsstellen sowie der möglichen Rekrutierung von akzessorischen Proteinen durch die glucosylierten Rho-GTPasen innerhalb dieser Membrandomäne dar.

Die vorliegende Arbeit ergänzt nicht nur das von Just et al. (2004) aufgestellte Modell der funktionellen Auswirkung der TcdB-vermittelten Glucosylierung der Rho-GTPasen. Sie zeigt auch ein durchaus komplexeres Bild der zytotoxischen Wirkung von TcdB auf. So wurde hier gezeigt, dass TcdB nicht lediglich einen Einfluss auf die Effektorbindung seiner Substrate ausübt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass TcdB auch einen Effekt auf die mRNA-Stabilität und damit auf die Modulierung der Proteinkonzentration seiner Substrat-GTPase besitzt. Dabei scheint dieser Effekt nicht allgemeingültig für die Mitglieder der gleichen Rho-Subfamilie zu sein, da es durch die Applikation von TcdB auf kultivierte Zellen nicht zu einer drastischen Hochregulation der RhoA-Proteinkonzentration kam. Welche funktionellen Auswirkungen die Hochregulation der RhoB-Konzentration im Zusammenspiel mit der anschließenden Glucosylierung von RhoB im Hinblick auf die zytotoxische Wirkung von TcdB besitzt, bleibt zu klären. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, den Einfluss von RhoB auf das Aktinzytoskelett genauer zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen auch die Wichtigkeit, die Wirkung von TcdB nicht nur auf RhoA, Rac1 und Cdc42, sondern auch auf die weiteren Mitglieder der Rho-GTPasen im Detail zu untersuchen, um die sehr wohl komplexe Wirkungsweise des TcdB zu verstehen und damit auch einen tieferen Einblick in die Signaltransduktion der niedermolekularen GTPasen der Rho-Familie zu erhalten. In dieser Hinsicht kann RhoG von besonderem Interesse sein. RhoG gehört wie RhoB zu den Mitgliedern der Rho-Familie, die kurzlebige Proteine darstellen und deren Expression durch genotoxischen Stress oder auch über

Wachstumsfaktoren reguliert werden, während RhoA, Rac1 und Cdc42 in den meisten Geweben sowohl im Hinblick auf die Stabilität der mRNA als auch im Hinblick auf die Stabilität des Proteins relativ stabil sind (Malcom et al. 2003; Wennerberg et al. 2004).

7 Literaturverzeichnis

Adamson, P., Marshall, A., and Tilbrook, P. A.: Post-translational modifications of p21 rho proteins. **J Biol Chem** **267** (1992a) **20033-20038**

Adamson, P., Paterson, H. F., and Hall, A.: Intracellular localization of the p21 rho proteins. **J Biol Chem** **119** (1992) **617-627**

Ahlgren, T., Florin, I., Jarstrand, C., and Thelestam, M.: Loss of surface fibronectin from human lung fibroblasts exposed to cytotoxin from *Clostridium difficile*. **Infect Immun** **39** (1983) **1470-1472**

Aspenström, P., Fransson, A., and Saras, J.: Rho GTPases have diverse effects on the organisation of the actin filament system. **Biochem. J.** **377** (2004) **327-337**

Backlund Jr., P. S.: Post-translational processing of RhoA. **J Biol Chem** **272** (1997) **33175-33180**

Barbieri, J. T., Riese, M. J., and Aktories, K.: Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. **Annu Rev Cell Dev Biol** **18** (2002) **315-344**

Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P., and Niggli, V.: Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. **J Cell Biol** **151** (2000) **1067-1079**

Barroso, L. A., Moncrief, J. S., Lyster, D. M., and Wilkins, T. D.: Nucleotide sequence of the *Clostridium difficile* toxin B. **Nucleic Acids Res** **18** (1990) **4004**

Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., and Aktories, K.: Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. **J Biol Chem** **276** (2001) **10670-10676**

Bishop, A. L., and Hall, A.: Rho GTPases and their effector proteins. **Biochem J** **348** (2000) **241-255**

Boquet, P., and Lemichez, E.: Bacterial virulence factors targeting rho GTPases : parasitism or symbiosis ? **Trends in Cell Biol** **13** (2003) **238-246**

Braga, V., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A.: The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. **J Cell Biol** **139** (1997) 1421-1431

Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R. G.: ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol** **3** (2002) 586-599

Busch, C., and Aktories, K.: Microbial toxins and the glucosylation of rho family GTPases. **Curr Opin Struct Biol** **10** (2000) 528-535

Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, J., Jeckel, D., and Aktories, K.: A common motif of eukaryotic glucosyltransferases is essential for the enzym activity of large clostridial cytotoxins. **J Biol Chem** **273** (1998) 19566-19572

Chaves-Olarte, E., Freer, E., Parra, A., Guzman-Verri, C., Moreno, E., and Thelestam, M.: R-Ras glucosylierung and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains. **J Biol Chem** **278** (2003) 7956-7963

Chaves-Olarte, E., Weidmann, M., Von Eichel-Streiber, C, and Thelestam, M.: Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. **J Clin Invest** **100** (1997) 1734-1741

Chuang, T., Hahn, K. Lee, J., Danley, D.E., and Bokoch, G.M.: The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T-lymphocytes. **Mol. Biol. Cell.** **8** (1997) 1687-1698

Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., and Hynes R.O.: Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. **J. Cell. Biol.** **142** (1998) 573-586

Clerk, A., Pham, F. H., Fuller, S. J., Sahai, E., Aktories, K., Marais, R., Marshall, C., and Sugden, P. H.: Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. **Mol Cell Biol** **21** (2001) 1173-1184

Del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H., Anderson, R. W., and Schwartz, M. A.: Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. **Science** **303** (2004) 839-842

Del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N. B., Meller, N., Hahn, K. M., and Schwartz, M. A.: Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. **Nature Cell Biology** **2** (2002) 232-239

DeWeerd, W. F. C., and Leeb-Lundberg, L. M. F.: Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α q and G α 12 in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **J Biol Chem** **272** (1997) 17858-17866

Dillon, S. T., Rubin, E. J., Yakubovich, M., Pothoulakis, C., LaMont, J. T., Feig, L. A., and Gilbert, R. J.: Involvement of Ras-related rho proteins in the mechanisms of action of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. **Infect Immun** **63** (1995) 1421-1426

Dove, C. H., Wang, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D., and Johnson, J. L.: Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. **Infect Immun** **58** (1990) 480-488

Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clement, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, R., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. : CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict RhoGTPase activation for bacterial host cell invasion. **Cell** **111** (2002) 553-564

Dvorsky, R., Blumenstein, L., Vetter, I. R., and Ahmadian, M. R.: Structural insights into the interaction of ROCK I with switch regions of RhoA. **J Biol Chem** **279** (2004) 7098-7104

Etienne-Manneville S., and Hall, A.: Rho-GTPases in cell biology **Nature** **420** (2002) 629-635

Fang, L., and Casey, P. J.: Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. **Annual Reviews of Biochemistry** **65** (1996) 241-269

Faure J., and Dagher, M. C.: Interaktions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (rho-GDI) **Biochimie** **83** (2001) 409-414

Faust, C., Ye, B., and Song, K.P.: The enzymatic domain of *Clostridium difficile* toxin A is located within its N-terminal region. **Biochem Biophys Res Commun** **251** (1998) 100-105

Fessler, M. B., Arndt, P. G., Frasch, S. C., Lieber, J. G., Johnson, C. A., Murphy, R. C., Nick, J. A., Bratton, D. L., Malcom, K. C., and Worthen, G. S.:

Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. **J Biol Chem** **279** (2004) **9989-39998**

Fiorentini, C., Malorni, W., Paradisi, S., Giuliano, M., Mastrantonio, P., and Donelli, G.: Interaction of *Clostridium difficile* toxin A with cultured cells: cytoskeletal changes and nuclear polarization. **Infect Immun** **58** (1990) **2329-2336**

Flatau, G., Landraud, L., Boquet, P., Bruzzone, M., and Munro, P.: Deamidation of RhoA glutamine 63 by the *Escherichia coli* CNF1 toxin requires a short sequence of the GTPase switch 2 domain. **Biochem Biophys Res Commun** **267** (2000) **588-592**

Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. : Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. **Nature** **387** (1997) **729-733**

Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Gingras, D., and Beliveau, R.: Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDI dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. **Biochem J** **361** (2002) **243-254**

Fritz, G., and Kaina, B.: Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. **Biochem Biophys Res Commun** **268** (2000) **784-789**

Fritz, G., and Kaina, B.: Ras-related GTPase RhoB represses NF-kappaB signaling. **J Biol Chem** **276** (2001) **3115-3122**

Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., and Kaina, B.: Rho GTPases in human breast tumors: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. **British Journal of Cancer** **87** (2002) **635-644**

Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K.: The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA-damaging treatments. **J Biol Chem** **270** (1995) **25172-25177**

Galbiati, F., Razani, B., Lisanti, M. P.: Emerging themes in lipid rafts and caveolae. **Cell** **106** (2001) **403-411**

Genth, H., Aktories, K., Just, I.: Monoglucosylation of RhoA at Threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. **J Biol Chem** **274** (1999) **29050-29056**

Genth, H., Gerhard, R., Maeda, A., Amano, M., Kaibuchi, K., Aktories, K., and Just, I.: Entrapment of rho ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme in the Rho-guanin nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. **J Biol Chem** **278** (2003) 28523-28527

Gerhard, R., Tadge, H., Genth, H., Thum, T., Borlak, J., Fritz, G., and Just, I.: Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. **J Biol Chem** **280** (2005) 1499-1505

Gingras, D., Gauthier, F., Lamy, S., Desrosiers, R. R., and Beliveau, R.: Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. **Biochem Biophys Res Com** **247** (1998) 888-893

Gosser, Y. Q., Nomanbhoy, T. K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione, R. A., and Rosen, M. K.: C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. **Nature** **387** (1997) 814-819

Hahn, A., Barth, H., Kress, M., Mertens, P. R., and Goppelt-Struebe.: Role of Rac and Cdc42 in lysophosphatidic acid-mediated cyclo-oxygenase-2 gene expression. **Biochem J** **362** (2002) 33-40

Hall, I. C., and O'Toole, E.: Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. **Am J Dis Child** **49** (1935) 309-402

Henriques, B., Florin, I., and Thelestam, M.: Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. **Microb Pathog** **2** (1987) 455-463

Hiaro, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., and Tsukita, S.: Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: Possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. **J Cell Biol** **135** (1996) 37-51

Hirshberg, M., Stockley, R. W., Dodson, G., and Webb, M. R.: The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. **Nat Struct Biol.** **4** (1997) 147-152

Hoffman, G. R., and Cerione, R. A.: Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. **FEBS Letters** **513** (2002) 85-91

Hoffman, G. R., Nassar, N., and Cerione, R. A.: Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. **Cell** **100** (2000) 345-356

Hofmann, F., Busch, C., and Aktories, K.: Chimeric clostridial cytotoxins: identification of the N-terminal region involved in protein substrate recognition. **Infect Immun** **66** (1998) 1076-1081

Hofmann, F., Busch, C., Prepens, I., Just, I., and Aktories, K.: Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. **J Biol Chem** **272** (1997) 11074-11078

Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T.: Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. **J Biol Chem** **273** (1998) 9656-9666

Jähner, D., and Hunter, T.: The ras-related gene rhoB is an immediate-early-gene inducible by v-Fps, Epidermal Growth Factor, and Platelet-Derived Growth Factor in rat fibroblasts. **Mol Cell Biol** **11** (1991) 3682-3690

Jiang, K., Delarue, F. L., and Sefti S. M.: EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. **Oncogene** **23** (2004) 1136-1145

Just, I., and Gerhard, R.: Large clostridial cytotoxins. **Rev Physiol Biochem Pharmacology** **152** (2004) 23-47

Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K.: Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. **Nature** **375** (1995a) 500-503

Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K.: The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. **J Biol Chem** **270** (1995b) 13932-13936

Kanzaki, M., and Pessin, J. E.: Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. **J Biol Chem** **277** (2002) 25867-25869

Kawamura, S., Miyamoto, S., and Brown, J. H.: Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae. **J Biol Chem** **278** (2003) 31111-31117

Keep, N. H., Barnes, M., Barsukov, I., Badii, R., Lian, L.Y., Segal, A. W., Moody, P. C., Roberts, G. C.: A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. **Structure** **5** (1997) **623-633**

Kinsella, B. T., Erdman, R. A., and Maltese, W. A.: Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by *rac1*, *rac2* and *ralA*. **J Biol Chem** **266** (1991) **9786-9794**

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L.: The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol Cell Biol** **15** (1995) **1942-1952**

Lanning, C. C., Daddona, J. L., Ruiz-Velasco, R., Shafer, S. H., and Williams, C. L.: The Rac1 C-terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. **J Biol Chem** **279** (2004) **44197-4420**

Lebowitz, P. F., Casey, P. J., Prendergast, G. C., and Thissen, J. A.: Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB. **J Biol Chem** **272** (1997) **15591-15594**

Lebowitz, P. F., DaVide, J. P., and Prendergast, G. C.: Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. **Mol Cell Biol** **15** (1995) **6613-6622**

Lerm, M., Pop, M., Fritz, G., Aktories, K., and Schmidt, G.: Proteasomal degradation of cytotoxic necrotizing factor 1-activated Rac. **Infect Immun** **70** (2002) **4053-4058**

Lian, L.Y., Barsukov, I., Golovanov, A.P., Hawkins, D.I., Badii, R., Sze, K.H., Keep, N.H., Bokoch, G.M., and Roberts, G.C.: Mapping the binding site for the GTP-binding protein Rac-1 on its inhibitor RhoGDI-1. **Structure Fold. Des.** **8** (2000) **47-55**

Lima, A. A. M., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J., and Guerrant, R. T.: Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. **Infect Immun** **56** (1988) **582-588**

Liu, A., Cerniglia, J., Bernhard, E. J., and Prendergast, G. C.: RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. **Proc Natl Acad Sci** **98** (2001) **6192-6197**

- Lyerly, D. M., Lockwood, D. E., Richardson, S. H., and Wilkins, T. D.: Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect Immun** **35** (1982) **1147-1150**
- Malcolm, T., Ettehadieh, E., and Sadowski, I.: Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability. **Oncogene** **22** (2003) **6142-6150**
- Michaely, P. A., Mineo, C., Ying, Y., and Anderson, R.: Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. **J Biol Chem** **274** (1999) **21430-21436**
- Moon, S. Y., and Zheng, Y.: Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends in Cell Biol.** **13** (2003) **13-22**
- Müller, H., von Eichel-Streiber, C., and Habermann, E.: Morphological changes of cultured cells after microinjection of toxins that act on cytoskeleton. **Infect Immun** **60** (1992) **3007-3010**
- Nobes, C.D., and Hall, A.: Rho, Rac and Cdc 42 regulate the assembly of multi-molecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. **Cell** **81** (1995) **53-62**
- Nomanbhoy, T. K., Erickson, J. W., and Cerione, R. A.: Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. **Biochemistry** **38** (1999) **1744-1750**
- Ottlinger, M. E., and Lin, S.: *Clostridium difficile* toxin B induces reorganisation of actin, vinculin, and talin in cultured cells. **Experiment Cell Res** **174** (1988) **215-229**
- Pan, J. Y., Wessling-Resnick, M.: GEF-mediated GDP/GTP exchange by monomeric GTPases: a regulatory role for Mg²⁺? **Bioessays** **20** (1998) **516-521**
- Pelletier, S., Duhamel, F., Coulombe, P., Popoff, M. R., and Sylvain, M. : Rho Family GTPases Are Required for Activation of Jak/STAT Signaling by G-Protein-Coupled Receptors. **Mol Cell Biol** **23** (2003) **1316-1333**
- Pfeifer, G., Schirmer, J., Leemhuis, J., Busch, C., Meyer, D. K., Aktories, K., and Barth, H.: Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukariotic cells. **J Biol Chem** **278** (2003) **44535-44541**

Pothoulakis, C., and Lamont J. T.: Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** **280 (2001)** G178-G183

Prendergast, G.C., Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Kurzawa, H., Lebowitz, P.F., and Der, C.J.: Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. **Oncogene** **10 (1995)** 2289-2296

Prior, I. A., and Hancock, J. F.: Compartmentalization of Ras proteins. **J Cell Science** **114 (2001)** 1603-1608

Richard, G., and Anderson, W.: The caveolae membrane system. **Annu Rev Biochem** **67 (1998)** 199-225

Ridley, A. J., and Hall, A.: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell** **70 (1992a)** 389-399

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A.: The small rho protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. **Cell** **70 (1992b)** 401-410

Ridley, A. J.: Rho Proteins: Linking Signaling with Membrane Trafficking. **Traffic** **2 (2001)** 303-310

Rojas, R., Ruiz, W. G., Wang, E., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Hughey, R. P., Dunn, K. W., and Apodaca, G.: RhoB-dependent modulation of early endocytic traffic in Madin-Darby canine kidney cells. **J Biol Chem** **2004 Aug 19** [Epub ahead of print]

Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., and Anderson, R. G.: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell** **68 (1992)** 673-682

Rothman S. W., Brown, J. E., Diecidue, A., and Foret, D. A.: Differential cytotoxic effects of toxin A and B isolated from *Clostridium difficile*. **Infec Immun** **46 (1984)** 324-331

Rupnik, M., Pabst, S., Rupnik, M., von Eichel-Streiber, C., Urlaub, H., and Soling, H. D.: Characterisation of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. **Microbiology** **151 (2005)** 199-208

Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., and Gierschik, P.: The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. **Nat Struct Biol.** **7 (2000) 122-126**

Schiavo, G., and van der Goot, F. G.: The bacterial toxin toolkit. **Nature** **2 (2001) 530-537**

Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B., and Van Aelst, L.: Rho GTPases signaling, migration, and invasion. **Exp Cell Res** **261 (2000) 1-12**

Sehr, P., Joseph, G., Genth, Just, I., Pick, E., and Aktories, K.: Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins – effect on nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. **Biochemistry** **37 (1998) 5296-5304**

Sekine, A., Fujiwara, M., and Narumiya, S.: Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. **J Biol Chem** **264 (1989) 8602-8605**

Senadheera, D., Haataja, L., Groffen, J., and Heisterkamp, N.: The small G protein Rac interacts with ubiquitination complex proteins Cullin-1 and CDC23. **Int J Mol Med** **(2001) 127-133**

Senda, T., Horiguchi, Y., Umemoto, M., Sugimoto, N., and Matsuda, M.: Bordetella bronchiseptica Dermonecrotizing toxin, which activates a small GTP-binding protein Rho, induces membrane organelle proliferation and Caveolae formation. **Exp Cell Res** **230 (1997) 163-168**

Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P.: Co-purification and direct Interaction of Ras with Caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. **J Biol Chem** **271 (1996) 9690-9697**

Sprang, S. R., and Coleman, D. E.: Invasion of the nucleotide snatchers: structural insights into the mechanism of G protein GEFs. **Cell** **95 (1998) 155-158**

Stahlhut, M., and van Deurs, Bo.: Identification of filamin as a novel ligand for Caveolin-1: Evidence for the organisation of Caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. **Mol Biol Cell** **11 (2000) 325-337**

Symons, M., and Settleman, J.: Rho family GTPases: more than simple switches. **Trends Cell Biol** **10 (2000) 415-9**

- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., and Takai, Y.: Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with Ezrin/Radixin/Moesin initiates the activation of the Rho small G protein. **J Biol Chem** **272** (1997) **23371-23375**
- Tato, C. M., and Hunter, C. A.: Host-pathogen interactions: Subversion and utilization of the NF-kappaB pathway during infection. **Infect Immun** **70** (2002) **3311-3317**
- Taylor, N. S., Thorne, G. M., and Bartlett, J. G.: Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. **Infect Immun** **34** (1981) **1036-1043**
- Vanni, C., Parodi, A., Mancini, P., Visco, V., Ottaviano, C., Torrisi, R., and Eva, A.: Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl *in vivo*. **Oncogene** (2004) **1-9**
- Vetter, I. R., Hofmann, F., Wohlgemuth, S., Herrmann, C., and Just, I.: Structural consequences of mono-glucosylation of H-Ras by *Clostridium sordellii*. **J Mol Biol** **301** (2000) **1091-1095**
- Watson, R. T., Shigematsu, S., Chiang, S., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I. G., Saltiel, A. R., and Pessin, J. E.: Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. **J Cell Biol** **154** (2001) **829-840**
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., and Derewenda, Z. S.: Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. **Nature Structural Biology** **4** (1997) **699-703**
- Wennerberg, K., and Der, C. J.: Rho-family GTPases: It's not only Rac and Rho (and I like it). **J Cell Sci** **117** (2004) **1301-1312**
- Westmark, C. J., Bartleson, V. B., and Malter, J. S.: RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. **Oncogene** **24** (2005) **502-511**
- Yamada, E.: The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **J Biophys Biochem Cytol** **1** (1955) **445-458**
- Yamaga, M., Sekimata, M., Fujii, M., Kawai, K., Kamata, H., Hirata, H., Homma, Y., and Yagisawa, H.: A PLCdelta1-binding protein, p122/RhoGAP, is localized in caveolin-enriched membrane domains and regulates caveolin internalization. **Genes Cells** **9** (2004) **25-37**

Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honore, N., Rousseau-Merck, M. F., Tavitian, A., and Olofson, B.: Rho-GDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI-Protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. **J Biol Chem** **271** (1996) **30366-30374**

Zhou, K., Wang, Y., Gorski, J.L., Nomura, N., Collard, J., and Bokoch, G.M.: Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc 42. **J Biol Chem** **273** (1998) **16782-16786**

8 Veröffentlichungen

Abstracts

Hartmann, B., Just, I., and Genth, H.: Intracellular stability of rho proteins glucosylated by *Clostridium difficile* Toxin B. NAUNYN-SCHMIEDERBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 367: 205 Suppl. 1 MAR 2003.

Poster: DGPT Frühjahrstagung, Mainz.

Hartmann B., Fritz, G., Just, I., and Genth, H.: Intracellular stability of the RhoB GTPase glucosylated by *Clostridium difficile* Toxin B. NAUNYN-SCHMIEDERBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 369: R53-R53 212 Suppl. 1 MAR 2004.

Poster: DGPT Frühjahrstagung, Mainz.

Huelsenbeck, J., **Hartmann, B.**, Gerhard, R., Fritz, G., Hofmann, F., Just, I., and Genth, H.: Difference in Rho-GTPase substrate specificity between wildtype and recombinant *Clostridium difficile* Toxin B. NAUNYN-SCHMIEDERBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY; 369: R53-R53 211 Suppl. 1 MAR 2004.

Poster: DGPT Frühjahrstagung, Mainz.

Poster

Kuipers, J. G., **Hartmann, B.**, Bialowons, A., Gu, J., Yu, D. T. Y., Zeidler, H. (2000): *Chlamydia trachomatis* induced gene expression in human monocytes analyzed by Microarray. Poster. IV European Chlamydia Congress, Helsinki, Finland.

Kuipers, J. G., **Hartmann, B.**, Bialowons, A., Rihl, M., Seta, N., Gu, J., Yu, D. T. Y., Zeidler, H. (2000): *Chlamydia trachomatis* induced gene expression in human monocytes from spondylarthritis (SPA) patients and healthy controls. Poster. American Congress of Rheumatism, Philadelphia, USA.