

## Stefan Carle



**2017:** Gastaufenthalt an der Universität Padua im Rahmen des Doppelpromotionsprogramms der IGradU im Labor von Prof. Cesare Montecucco

**Seit 2015:** Teilnahme am Promotionsprogramm der „International Graduate School in Molecular Medicine“ an der Universität Ulm (IGradU) in der AG von Prof. Dr. Holger Barth

**2013-2015:** Master of Science in Pharmazeutischer Biotechnologie an der Universität Ulm und der Hochschule Biberach. Masterthesis am Institut für angewandte Biotechnologie in der AG von Prof. Dr. Katharina Zimmermann

**2009-2012:** Bachelor of Science in Biologie an der Universität Tübingen. Bachelorthesis am ZMBP in der Abteilung Allgemeine Genetik in der AG von Prof. Dr. Ulrike Zentgraf

### „Exploitation of non-toxic diphtheria toxin for molecular Trojan horse development“

**Stefan Carle, Maximilian Fellermann und Holger Barth**

**Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm**

Biologische Membranen verhindern effizient das ungehinderte, unspezifische Eindringen von größeren Proteinen und anderen Makromolekülen in Zellen. Dies hat zum einen zur Folge, dass diese in der Regel nur über selektive Transportmechanismen aufgenommen werden können und vermeidet so auch die Aufnahme von zum Teil schädlichen Substanzen. Zum anderen können sich aber Probleme ergeben, wenn vielversprechende therapeutische Moleküle mangels effizienten Transports nicht an ihren Wirkort gelangen können. Von besonderer Bedeutung ist diese Barrierefunktion an hochempfindlichen Bereichen des Körpers wie dem zentralen Nervensystem (ZNS) und dem Gehirn. Hier bilden die Endothelzellen der versorgenden Blutgefäße eine beinahe undurchdringliche Zellschicht, die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BHS), die das Eindringen von unerwünschten Substanzen zum Großteil ausschließt. Nur notwendige Makromoleküle, wie Zucker und Aminosäuren werden gezielt über Transporter ins ZNS gebracht. Daher ist die Behandlung von Pathologien im Gehirn mit traditioneller Medikation eine große Herausforderung.

Um dieses Hindernis gezielt zu umgehen können Proteine verwendet werden, von welchen bekannt ist, dass diese aktiven Transport an der entsprechenden Membran vollziehen. Solche Transportermoleküle können als Fähre für „Cargo“-Moleküle dienen und werden entsprechend auch als molekulare Trojanische Pferde (MTP) bezeichnet.

Ein vielversprechender Ansatzpunkt ist die Verwendung von enzymatisch inaktivem Diphtherietoxin (DT), welches Zellen nicht mehr vergiftet, aber noch sehr effektiv in diese aufgenommen wird und dadurch in der Lage ist, den Transport von angehängten Molekülen in Zellen und deren Translokation aus Endosomen in das Zytosol zu vermitteln. Interessanterweise ist der spezifische DT-Rezeptor auf Zellen der BHS und einigen Glioblastomzelllinien überexprimiert. DT gehört zu den bakteriellen AB-Toxinen und wird von virulenten *Corynebacterium diphtheriae* Stämmen sezerniert, was die typischen Symptome der Diphtherie im Rachenraum verursacht. Das Toxin besteht aus einem Protein mit zwei distinkten Domänen: Die A-Domäne, welche enzymatisch aktiv ist und den Elongationsfaktor 2 ADP-ribosyliert, dadurch die

Proteinbiosynthese inhibiert und schlussendlich die Zelle abtötet, sowie die B-Domäne, die für Rezeptorbindung und Translokation notwendig ist.

In unserer Arbeitsgruppe verwenden wir die gut etablierte Mutante CRM197 von DT, die durch einen spezifischen Aminosäureaustausch in der A-Domäne ihre toxische Aktivität verliert. Bereits zuvor konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass „fremde“ Proteine, die N-terminal an CRM197 fusioniert wurden, in das Zytosol von Zielzellen gebracht werden können und dass CRM197 neben der Translokation in das Zytosol auch eine Transzytose über Zellen der BHS ausführen kann. Wir möchten nun beide Erkenntnisse kombinieren und ein MTP entwickeln, welches effizient Substanzen über die BHS transportiert. Dafür haben wir zunächst die fehlende Toxizität von CRM197 und darauf basierenden Konstrukten in zellbasierten und biochemischen Analysen verifiziert. Durch Kompetition mit wildtypischem DT und fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte die Bindungsspezifität der CRM-Konstrukte sichergestellt werden. Neben der Bindung an den Oberflächenrezeptor konnte auf diesem Weg auch der Transport eines Modell-Proteins über CRM197 in Zellen nachgewiesen werden. Durch Einsatz von CRM197-Varianten, die entweder nicht mehr an den DT-Rezeptor binden, oder eine funktionelle Mutation in der Translokationsdomäne der B-Untereinheit tragen, werden die molekularen Mechanismen genauer untersucht, welche entweder die Translokation in das Zytosol oder die Transzytose von CRM197 über bestimmte Epithelzellen vermitteln. Zudem wurde eine Methode etabliert, um pharmakologisch wirksame Moleküle an CRM197 zu koppeln und diese somit in das Zytosol oder über Zellbarrieren hinweg zu transportieren.

In nachfolgenden Experimenten soll nun gezeigt werden, ob der Transporter auch auf durchgängigen Zellschichten anwendbar ist, die als Modell der BHS dienen. Ein Ziel dieser Arbeiten ist der Transport anti-tumor Peptide in Krebszellen, um deren Wachstum zu inhibieren. Diese Arbeiten sind zum Teil finanziert durch die *International Graduate School in Molecular Medicine Ulm* (IGradU) und finden u. a. im Rahmen des Ulmer SFB 1279 „Nutzung des menschlichen Peptidoms zur Entwicklung neuer antimikrobieller und anti-Krebs Therapeutika“ statt.