

Kurzvortrag „5th German Pharm-Tox Summit“

Name:

Fellermann, Maximilian, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm

Autoren:

Maximilian Fellermann¹, Fanny Wondany², Stefan Carle¹, Jens Michaelis², Holger Barth¹

¹Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm

²Institut für Biophysik, Universität Ulm

Bakterielle Exotoxine als Zellmembran oder Blut-Hirn-Schranken penetrierende Transporter für therapeutische Peptide

Die Entwicklung von Biopharmazeutika, wie therapeutischen Peptiden oder Proteinen nimmt in der modernen Pharmakologie immer weiter zu. Ein großes Problem bei der Entwicklung stellen jedoch zelluläre Barrieren da. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) oder die eukaryotische Zellmembran können verhindern, dass die Medikamente ihren Wirkort erreichen und sind somit unwirksam.

Um dieses Problem zu lösen werden nicht-toxischen Mutanten bakterieller AB-Toxine als Transporter von Biopharmaka erforscht. Diese Toxine gehören zu den toxischsten, bekannten Substanzen. Sie besitzen eine enzymatisch aktive A-Untereinheit, welche durch einen effizienten und ausgeklügelten Mechanismus von der B-Untereinheit ins Zytosol von Zielzellen eingeschleust wird [1]. Ein Beispiel für ein relativ gut charakterisiertes AB-toxin ist das Diphtherie Toxin (DT). Um den Transportmechanismus von DT nutzen zu können ohne den Zielzellen zu schaden, werden Mutanten verwendet deren B-Untereinheit funktionsfähig ist, während die A-Untereinheit jedoch inaktiv vorliegt. „Cross-reacting material 197“ (CRM197) ist eine solche Mutante, die den idealen Grundbaustein für die Entwicklung solcher molekularer Trojanischen Pferde bietet. Im klassischen Aufnahmeweg bindet DT mit seiner Rezeptor-Bindedomäne (R-Domäne) an den DT-Rezeptor, was zur Internalisierung führt. Nach der Ansäuerung von frühen Endosomen lagert sich höchstwahrscheinlich die Transmembrandomäne (T-Domäne) in die Membran ein und vermittelt die Translokation der katalytischen (C-) Domäne ins Zytosol [2]. Neben dem klassischen Weg, wurde in neueren Publikationen wurde gezeigt, dass CRM197 *in vivo* auch dazu eingesetzt werden kann Frachtmoleküle über die BHS zu transportieren [3]. Trotz dieser neuen Erkenntnisse ist die Aufnahme nicht in allen Details verstanden. Es ist zum Beispiel unklar welche Rolle der DT-Rezeptor für den Transzytoseprozess spielt. Darum war es unser Ziel den Aufnahmeprozess genauer zu erforschen und die neuen Ergebnisse einzusetzen, um die Effizienz der Transporter für einen spezifischen Transportweg zu erhöhen. Um dieses Ziel zu erreichen wurde ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP) an CRM197 gekoppelt. eGFP dient als Modell für ein Frachtmolekül und erlaubt es die zelluläre Aufnahme zu verfolgen und zu quantifizieren. Basierend auf diesem Fusionsprotein wurden mehrere CRM197-Mutanten generiert, bei denen das Wissen über bereits charakterisierte DT-Mutanten eingesetzt wurde. Bei einigen Mutanten sollte die Bindung an den DT-Rezeptor durch Mutationen oder das komplette Entfernen der R-domäne deutlich beeinträchtigt sein. Überraschenderweise, binden die generierten Mutanten trotzdem noch an die Zelloberfläche von HeLa Zellen und werden in diese Zellen aufgenommen. Mittels Durchflusszytometrie und „Stimulated emission depletion (STED)“ superhochauflösender Fluoreszenzmikroskopie wurden diese Prozesse genau untersucht und quantifiziert. Durch das Entfernen weiterer CRM197-domänen konnte gezeigt werden, dass die T-Domäne

wahrscheinlich die R-Domäne in der Bindung an den DT-Rezeptor unterstützt. In ersten vorläufigen Experimenten wurde dieses neue Wissen eingesetzt und eine neue CRM197-Mutante entdeckt, welche durch eine Mutation in der T-Domäne in Kombination mit der Wildtyp R-Domäne eine deutlich verstärkte Bindung und auch Aufnahme in verschiedene Zellen zeigt. Möglicherweise könnte diese neue Mutante dazu eingesetzt werden die Transporteffizienz von CRM197 zu steigern.

Zusammenfassend wurden verschiedene CRM197-Mutanten generiert, um den Transport von Biopharmaka über die BHS oder ins Zytosol von Zellen zu ermöglichen. Dabei wurde gezeigt, dass die T-domäne von CRM197 die R-Domäne bei der Rezeptorbindung unterstützt, was dazu genutzt werden könnte die Transporteffizienz zu steigern.

1. Barth H. Exploring the role of host cell chaperones/PPIases during cellular up-take of bacterial ADP-ribosylating toxins as basis for novel pharmacological strategies to protect mammalian cells against these virulence factors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;383:237–45. doi:10.1007/s00210-010-0581-y.
2. Bennett MJ, Eisenberg D. Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* 1994;3:1464–75. doi:10.1002/pro.5560030912.
3. Wang P, Liu Y, Shang X, Xue Y. CRM197-induced blood-brain barrier permeability increase is mediated by upregulation of caveolin-1 protein. *J Mol Neurosci.* 2011;43:485–92. doi:10.1007/s12031-010-9471-5.

Graphische Zusammenfassung:

