

**Rezeptor-Ligand-Interaktionen
von Toxinen aus pathogenen
Escherichia coli-Bakterien**

Dissertation

im Fach Molekulare Biotechnologie

der

Universität Bielefeld

Technische Fakultät

vorgelegt von

Christian Henning Schweppe

Erstgutachter: Prof. Dr. Johannes Müthing
Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Noll

Bearbeitungszeitraum: Okt. 2005 – Juli 2009
Münster, Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Vorwort.....	XI
1.1 Veröffentlichungen	XI
1.1.1 Publikationen	XI
1.1.2 Vorträge	XII
1.1.3 Poster	XIII
2 Danksagungen.....	XV
3 Einleitung	1
4 Theorie	3
4.1 EHEC Infektionen	3
4.2 Pathogenitätsfaktoren von EHEC	5
4.2.1 Shiga Toxin (Stx).....	6
4.2.2 EHEC-Hämolysin (EHEC-Hly)	11
4.2.3 Extrazelluläre Serin Protease plasmidkodiert (EspP).....	12
4.2.4 Cytolethal Distending Toxin (Cdt).....	13
4.2.5 Adhäsive Virulenzfaktoren.....	14
4.3 Zelloberflächenrezeptoren	16
4.3.1 Glykosphingolipide (GSL)	18
4.4 Detektionsverfahren.....	20
4.4.1 Immunchemische Nachweismethoden	20
4.4.2 Massenspektrometrische Nachweistechiken	20
4.5 Endothelzellen, fötales Kälberserum und humanes Plasma	22
4.5.1 Endothelzellen	22
4.5.2 Fötales Kälberserum (FCS)	22
4.5.3 Humanes Plasma.....	22
5 Zielsetzung.....	23
6 Materialien und Methoden	25
6.1 Endothelzellen, fötales Kälberserum und humanes Plasma	25
6.1.1 Endothelzellen	25
6.1.2 Fötales Kälberserum (FCS)	28
6.1.3 Humanes Plasma.....	28

6.2	Antikörper.....	29
6.3	Immunfluoreszenz (IF)	30
6.4	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
6.5	Dünnschichtchromatographie	35
6.5.1	Trennung von Monohexosylceramiden per DC	36
6.5.2	Overlay-Assay	37
6.5.3	Gesamtzuckerfärbung	38
6.5.4	Lipidfärbung	39
6.5.5	Dokumentation	40
6.5.6	Extraktion von GSL aus Kieselgelplatten	40
6.6	Massenspektrometrische Verfahren	40
6.6.1	Elektrospray Ionisations Quadrupol Massenspektrometrie (ESI-Q-TOF MS) ...	41
6.6.2	Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS).....	44
6.6.3	Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF)	47
7	Ergebnisse.....	49
7.1	Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren aus EHEC mittels MALDI-TOF MS	49
7.1.1	Stx49	
7.1.2	EHEC-Hly	57
7.1.3	EspP	60
7.1.4	Cdt	63
7.1.5	SfpA.....	66
7.1.6	EibG.....	68
7.2	Neutrale GSL aus Endothelzellen.....	72
7.2.1	Immunfluoreszenzmikroskopie von nGSL aus Endothelzellen	72
7.2.2	Polymerasekettenreaktion von Glykosyltransferasen aus humanen Endothelzellen	75
7.2.3	Dünnschichtchromatographie	76
7.2.4	Massenspektrometrie von nGSL aus Endothelzellen	77
7.3	Neutrale GSL aus FCS	84
7.3.1	Dünnschichtchromatographie von nGSL aus FCS	84
7.3.2	Massenspektrometrie von nGSL aus FCS	85
7.4	Neutrale GSL aus humanem Plasma	89
7.4.1	Dünnschichtchromatographie von nGSL aus humanem Plasma.....	89
7.4.2	Massenspektrometrie von nGSL aus humanem Plasma.....	90
7.4.3	Neutrale GSI aus humanen Lipoproteinfraktionen	99
8	Diskussion.....	102
8.1	Stx und Stx-unabhängige Pathogenitätsfaktoren	102

8.2	Neutrale GSL aus humanen Endothelzellen	105
8.3	Neutrale GSL aus FCS	110
8.4	Neutrale GSL aus humanem Plasma	112
9	Zusammenfassung und Ausblick	114
	Anhang A: Aminosäuren.....	119
	Anhang B: Chemikalien	120
	Lebenslauf.....	137
	Literaturverzeichnis	121
	Erklärung.....	139

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Asymptomatische Ausscheider
AK	Antikörper
α1,4GalT	α1,4-Galaktosyltransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
A-Untereinheit	<i>active-</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BD	Blutige Diarrhöe
Biotech	Biotechnologie
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
B-Untereinheit	<i>binding-</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C/M	Chloroform/Methanol
C/M/W	Chloroform/Methanol/Wasser
C ₂₄₂	Cystein an Aminosäureposition 242 in einer Sequenz
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAM-C	Caramidomethylierung con Cystein
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
Cdt	<i>cytolethal distending toxin</i>
Cer	Ceramid

Chy	Chylomikronen
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Diarrhöe
d	Weg (engl: <i>distance</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamin-2'-phenylindol-dichlorid
DC	Dünnschichtchromatographie
Deam	Deamidierung
DHB	Dihydroxybenzoesäure
Dipl	Diplom
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dr	Doktor
DTAF	Dichlorotriazinylamino Fluoreszein
e	Elementarladung
E	Einheit
EA.hy 926	Fusionszelllinie aus HUVECs und der Lungenkarzinomzelllinie A549
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDL 933	<i>E. coli</i> Stamm
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EHEC-Hly	EHEC-Hämolysin
EibG	<i>Escherichia coli</i> Immunglobulin-bindendes Protein G
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
E _{kin}	kinetische Energie
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisation
EspP	extrazelluläre Serinprotease plasmidkodiert

et al.	et alii
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
exp	experimentell
FCS	Fötales Kälberserum
Fuc	Fukose
g	Gramm
G2/M	Übergang zwischen den Zellteilungsphasen G2 und M
Gal	Galaktose
GalCer	Galaktosylceramid
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalaktosamin
Gb	Globo
Gb3	Globotriaose
Gb4	Globotetraose
Gb3Cer	Globotriaosylceramid
Gg	Ganglio
Glc	Glukose
GlcCer	Glukosylceramid
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
Glu-C	Endoproteinase Glu-C
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSL	Glykosphingolipid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i>
HC	Hämorrhagische Colitis
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
Hex	Hexose
HexNAc	<i>N</i> -Acetyl-Hexosamin
HPI	Hoch Pathogenitätsinsel (engl: <i>high pathogenicity island</i>)

HPTLC	<i>high-performance thin-layer chromatography</i>
HS	Laborjournalcode für Henning Schweppe
huPlasma	humanes Plasma
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IDL	<i>intermediate density lipoproteins</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
Ig	Immunglobulin
IUPAC-IUB	<i>Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry</i>
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
JCBN	<i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>
JM	Laborjournalcode für Johannes Müthing
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
Lc	Lakto
Lc2Cer	Laktosylceramid
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
LPF	<i>long polar fimbriae</i>
m	Masse
M	mol/L
[M+X]	Molekül + Ladung
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MCP	<i>multichannelplate</i>
MeOH	Methanol

Met-ox	Oxidierung von Methionin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Monohexosylceramid
ml	Milliliter
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mM	Millimol/L
Mo	Molybdän
mod	Modifikation
MoO ₃	Molybdänoxid
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
n. d.	nicht detektiert
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	5- <i>N</i> -Glykolyneuraminsäure
nGSL	neutrale Glykosphingolipide
nLc	Neolakto
nLc4Cer	Neolaktotetraosylceramid
nm	Nanometer
o	orthogonal
P	<i>platelet</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl: <i>polymerase chain reaction</i>)

PD	Privatdozent
PMF	Peptid-Massen-Fingerabdruck
pO157	Plasmid O157
ppm	<i>parts per million</i>
Prof.	Professor
pyroGlu	Pyroglutamat
Q	Quadrupol
rel. E.	relative Einheit
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
RTX	<i>repeats in toxin</i>
S	Svedberg
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl: <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
sf	<i>sorbitol fermenting</i>
sfa	<i>S fimbriae major subunit</i>
sfp	<i>sorbitol fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded</i>
β1,3GalNAcT	β1,3-N-Acetylgalaktosaminyltransferase
β1,4GalT	β1,4-Galaktosyltransferase
Std	Standard
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shiga Toxin
t	Zeit
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
theor	theoretisch
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TOF	<i>time-of-flight</i> , Flugzeit
Try	Trypsin
U _e	Beschleunigungsspannung

UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
vgl.	vergleiche
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
WHO	<i>world health organization</i>
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

1 Vorwort

Die hier vorgelegte Doktorarbeit wurde an den Instituten für Medizinische Physik und Biophysik sowie für Hygiene der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster im Rahmen einer externen Doktorarbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld von Oktober 2005 bis Juli 2009 durchgeführt. Die Betreuung der Arbeit übernahmen die Herren Prof. Dr. Johannes Müthing und Prof. Dr. Helge Karch. Für die Begutachtung der Arbeit stellten sich Prof. Dr. Johannes Müthing aus dem Institut für Hygiene der WWU Münster und Prof. Dr. Thomas Noll aus der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld freundlicherweise zur Verfügung. Die Finanzierung erfolgte durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung Münster (IZKF, Projekt: Ka2/061/04) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Projekt: FBIzoo IP04).

1.1 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit sind wie folgt veröffentlicht worden:

1.1.1 Publikationen

Bauwens A, Bielaszewska M, Karch H, **Schweppe CH**, Reichelt R, Kemper B, Langehanenberg P, von Bally G, Peter-Katalinić J, Müthing J. Investigation of Shiga toxin induced cellular damage. *Int. J Med Microbiol.* 2007. 297: 57-58.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Characterization of Shiga toxin 1 receptors by mass spectrometry. *Int J Med Microbiol.* 2007. 297: 56.

Hulsewig M, **Schweppe CH**, Friedrich AW, Karch H, Dreisewerd K, Peter-Katalinić J, Müthing J. *Int J Med Microbiol.* 2008. 298: 74.

Brockmeyer J, **Schweppe CH**, Kuczius T, Karch H. Functional characterization of the serine protease autotransporter EspP from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 2008. 298: 26.

Müsken A, Bielaszewska M, Greune L, **Schweppe CH**, Müthing J, Schmidt H, Schmidt MA, Karch H, Zhang W. Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol. 2008. 74: 1087-93.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Pohlentz G, Friedrich AW, Büntemeyer H, Schmidt MA, Kim KS, Peter-Katalinić J, Karch H, Müthing J. Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. Glycoconj J. 2008. 25: 291-304.

Müthing J, **Schweppe CH**, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. Thromb Haemost. 2009. 101: 252-64.

Brockmeyer J, **Schweppe CH**, Müthing J, Bielaszewska M, Kehrel B, Karch H. EspP α from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves P-selectin. Thromb Haemost. (in Vorbereitung).

Brockmeyer J, Lindner H, Sarg B, **Schweppe CH**, Karch H. Characterisation of the extracellular serine protease EspP. J Bacteriol. (in Vorbereitung).

1.1.2 Vorträge

Schweppe CH, Nofer JR, Pohlentz G, Meisen I, Bielaszewska M, Friedrich AW, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Structural characterization and quantification of Shiga toxin-1-binding Gb3Cer (CD77) and Gb4Cer glycosphingolipids from human plasma. 16th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe

Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie" Hannover. 2005.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Karch H, Müthing J. Analysis of receptors for EHEC cytolethal distending toxin an human endothelial cells. DFG Meeting Oberbärenburg, SFB 293. 2007.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Massenspektrometrische Charakterisierung von Shiga Toxin 1-Rezeptoren aus Endothelzellen. EHEC Workshop Wildbad Kreuth. 2007.

Schweppe CH, Hülsewig M, Betz J, Friedrich AW, Müthing J, Karch H. Shiga toxin ligands in human endothelial cells and plasma. Symposium Mikrobielle Pathogenität Bad Urach. 2008.

Schweppe CH, Müthing J, Karch H. Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli*: Umwelt-Vektor-Mensch-Schnittstelle. FBIzoo Meeting Berlin. 2008.

1.1.3 Poster

Müthing J, **Schweppe CH**, Pohlentz G, Vakhrushev S, Büntemeyer H, Reichelt R, Bielaszewska M, Friedrich AW, Karch H, Peter-Katalinić J. Structural characterization of Shiga toxin 1-binding Gb3Cer (CD77) glycosphingolipids on human brain endothelial cells and EA.926 cells. Glyco XVIII Florenz. 2005.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Pohlentz G, Vakhrushev S, Friedrich AW, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Structural verification of immunohistochemically detected Shiga toxin 1-receptors on human endothelial cells by combined thin-layer chromatography immunostaining and mass spectrometry. DGMS Mainz. 2006.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Friedrich AW, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Structural characterization of high- and low-affinity receptors of Shiga toxin 1 in fetal calf serum by nanoESI Q-TOF mass spectrometry and high-performance thin-layer chromatography immunostaining. DGMS Bremen. 2007.

Schweppe CH, Bielaszewska M, Karch H, Peter-Katalinić J, Müthing J. Characterization of Shiga toxin 1-receptors by mass spectrometry. DGHM Göttingen. 2007.

Schweppe CH, Hülsewig M, Friedrich AW, Karch H, Dreisewerd K, Nofer JR, Peter-Katalinić J, Müthing J. Variable lipoprotein association and content of Shiga toxin glycosphingolipid ligands in human blood. Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie" Wageningen. 2008.

2 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Helge Karch, Direktor des Institutes für Hygiene der WWU Münster, gilt mein besonderer Dank. Ohne die Betreuung und Finanzierung meiner Doktorarbeit wäre die Dissertation in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

Über die gesamte Zeit meiner Arbeit stand mir Herr Prof. Dr. Johannes Müthing stets unterstützend zur Seite; als Betreuer während der Arbeit sowie als Gutachter der Dissertationsschrift. Ihm gilt mein besonderer Dank.

Bei Frau Prof. Dr. J. Peter-Katalinić möchte ich mich herzlich bedanken, dass sie mir die Durchführung meiner Arbeit in ihrer Abteilung ermöglichte. Ebenso danke ich den Herren PD Dr. Klaus Dreisewerd und Dr. Michael Mormann aus dem Institut für medizinische Physik und Biophysik (IMPB) der WWU für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Einführung in das komplexe Gebiet der Massenspektrometrie.

Ich möchte mich zudem bei der gesamten Arbeitsgruppe Biomedizinische Analytik des IMPB der Universität Münster für die Unterstützung bei dieser Arbeit und die immer freundliche Arbeitsatmosphäre herzlichst bedanken.

Ich danke Herrn PD Dr. A. Friedrich und Frau PD Dr. M. Bielaszewska aus dem Institut für Hygiene der WWU Münster für die Bereitstellung von Shiga Toxin 1 und 2 und des Anti-Stx1-Antikörpers, sowie Martina im Besonderen für die wirklich bereichernden Diskussionen über fachbezogene Themen jeglicher Art.

Ebenso gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes für Hygiene, in deren Kreis ich von Anfang an herzlich aufgenommen wurde und in dem ich bei Fragen immer Ansprechpartner gefunden habe.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Noll, Leiter der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. J.-R. Nofer und Frau Kathrin Scotch aus dem Institut für Arterioskleroserecherche in Münster für die Bereitstellung der Lipoproteinfraktionen aus humanem Plasma.

Herrn Prof. Dr. J. Lehmann, dem ehemaligen Leiter der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld und seinem Mitarbeiter Herrn AOR Dr. H. Büntemeyer möchte ich für die Einführung in die Zellkulturtechnik und das Erlernen der dafür nötigen Arbeitstechniken danken. Gelernt ist gelernt. Außerdem danke ich allen Professoren und Dozenten des Studiengangs „Molekulare Biotechnologie“ der Universität Bielefeld, die die Grundsteine für diese Arbeit legten.

Nicht zu vergessen sei natürlich die unersetzliche Doppelkopfrunde der Medizinischen Physik, die einem an so manchem verregneten Münsteraner Tag die Stimmung gehoben hat. In diesem Sinne... Re, keine 9.

Ich danke der Mensa II am Ring, ohne die ich die unzähligen Arbeitsstunden, die zur Durchführung dieser Arbeit notwendig waren, niemals körperlich durchgestanden hätte.

Den beiden „Jungs“ aus dem Institut für Hygiene, Dr. Jens Brockmeyer und Dr. Thomas Aldick, möchte ich an dieser Stelle besonders danken; für die zahlreichen fruchtenden wissenschaftlichen Diskussionen, aber auch die vielen netten privaten Gespräche sowie nicht zuletzt das gemeinsame Fußball spielen.

Herrn Dipl. Phys. Jens Soltwisch möchte ich an dieser Stelle auch noch einmal besonders danken. Ich denke, dass mit niemandem sonst das Messen am MALDI-oTOF so viel Freude gemacht hätte.

Ganz herzlich möchte ich Ute und Marcel danken, die zeitgleich mit mir begonnen haben und mit mir durch dick und dünn gegangen sind. Wir können stolz auf uns sein. Ute und Stephan sowie Judith und Tabea danke ich zudem für das fleissige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und natürlich Asco.

Zuletzt darf nicht vergessen werden, dass ohne ein Lächeln und ein bisschen Wärme in der Welt niemand glücklich werden kann. Ich danke Tabea, dass sie mir, ob früh, ob spät, ob Tag, ob Nacht, immer zur Seite gestanden hat und mir stets Kraft zum Weiterarbeiten gegeben hat.

3 Einleitung

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, welches zur Familie der Enterobacteriaceae gehört und den Verdauungstrakt von Warmblütern besiedelt. Es ist dabei nicht das zahlenmäßig bedeutendste Bakterium (Schlegel 7. Auflage), jedoch eines der am besten untersuchten. Neben den ubiquitären apathogenen *E. coli* gibt es eine Reihe humanpathogener *E. coli*, darunter enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), uropathogene (UPEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Letztgenannte wurden nach einem Ausbruch in den USA im Jahr 1982 zum ersten Mal als gefährlich wahrgenommen (WHO 2005). Dort identifizierte man aus Patienten isolierte *E. coli* O157:H7 Stämme als Verursacher von hämorrhagischer Colitis (HC) (Riley et al. 1983). Noch im selben Jahr wurde von einem sekretierten Protein mit zytotoxischen Effekten, ähnlich einem Toxin aus *Shigella dysenteriae* berichtet (O'Brien et al. 1982, 1983, Karmali et al. 1983). Das isolierte Toxin wurde wegen seines Potentials, Nierenzellen aus der afrikanischen grünen Meerkatze, sogenannte Verozellen, abzutöten als Verotoxin bzw. Verozytotoxin bezeichnet. Aufgrund der Ähnlichkeit zum aus *Shigella dysenteriae* isolierten Toxin werden die Bezeichnungen Shiga-like Toxin oder Shiga Toxin häufig synonym verwendet. Für *E. coli* mit der Fähigkeit zur Stx-Produktion wurde daraufhin die Bezeichnung Shiga Toxin-produzierende *E. coli* (STEC) eingeführt. Der Zusammenhang von gewissen STEC-Stämmen und dem Auftreten von HC oder dem Hämolytisch Urämischen Syndrom (HUS) machte allerdings eine Erweiterung der Nomenklatur unumgänglich, so dass STEC-Stämme, die HC oder HUS verursachen können, als enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) bezeichnet werden (Levine et al. 1987). Diese EHEC sezernieren eine Reihe von Faktoren, die ihre Pathogenität und die Schwere der Erkrankung beeinflussen, darunter einige, die einen Bakterien-Zell-Kontakt ermöglichen und andere, die die zytotoxische Wirkung der Bakterien verursachen.

Besonders problematisch ist die Tatsache, dass EHEC-Infektionen häufig Kinder unter 15 Jahren treffen (0,7 Fälle / 100000 Einwohner in den USA; WHO 2005), wobei die Schwere der Symptome von Unterleibskrämpfen über Diarrhöe und HC bis hin zum HUS reicht (vgl. **Kapitel 4.1**). Eine Infektion mit EHECs findet meistens über die Aufnahme von Lebensmitteln statt, vor allem von rohem Fleisch oder Rohmilch. Aber

auch eine Aufnahme der Bakterien über kontaminiertes Wasser oder den direkten Kontakt mit Tieren ist möglich (vgl. **Kapitel 4.1** und **Abbildung 1**) (Cieslak et al. 1993).

Um eine erfolgreiche Behandlung von Patienten mit EHEC-Infektionen zu gewährleisten und neue Therapie-Ansätze zu schaffen, ist es notwendig, dass die Faktoren, die die Bakterien zu ihrer Humanpathogenität befähigen, umfassend untersucht und charakterisiert werden. Jedes neue Wissen über die Struktur der Pathogenitätsfaktoren oder über ihren genauen Wirkmechanismus kann dabei neue Möglichkeiten für Therapieansätze schaffen. Diese Arbeit beschäftigt sich im Folgenden mit der Beschreibung einiger Pathogenitätsfaktoren aus EHEC sowie deren struktureller Charakterisierung und Wirkungsweise.

4 Theorie

In den folgenden Abschnitten wird der für das Verständnis dieser Arbeit essentielle theoretische Hintergrund beschrieben und näher erläutert. Dabei erfolgt zunächst ein Überblick über EHECs im Allgemeinen und über die einzelnen Pathogenitätsfaktoren im Speziellen. Im Anschluss folgt ein Abschnitt über die zellularen Rezeptoren, über die bakterielle membranständige und sekretierte Moleküle angreifen können und anschließend eine Beschreibung der Möglichkeiten zur Detektion von Toxinen und ihren Rezeptoren. Abschließend werden die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zellen und Serumtypen näher beschrieben.

4.1 EHEC Infektionen

EHEC stellen eine hoch infektiöse Untergruppe von darmpathogenen *E. coli* dar. Ihre Infektionen gelten, wie auch die der *Salmonellen* und *Listerien*, als Lebensmittel-assoziiert (in 63-85% aller Fälle; vgl. **Abbildung 1**) und sind ein Hauptverursacher von blutigen Durchfällen und akutem Nierenversagen (WHO 2005). Dabei reichen die auftretenden Symptome von Diarrhöe über eine HC bis in 3-7% aller Fälle zum HUS. Dieses äußert sich in Thrombozytopenie und einer mikroangiopatischen, hämolytischen Anämie und kann in schweren Fällen zum vollständigen Nierenversagen führen (Paton und Paton 1998, Gianviti et al. 2003, Tozzi et al. 2003). Das HUS wurde erstmals von Gasser im Jahr 1955 beschrieben (Gasser et al. 1955) und besitzt in akuten Fällen eine Mortalitätsrate von 2-5% (WHO 2005).

In den vergangenen Jahren kam es immer wieder zu sogenannten epidemiologischen Ausbrüchen, bei denen größere Personengruppen infiziert wurden. Häufig wurden hierbei EHEC als Krankheitsverursacher isoliert. So bekamen zum Beispiel im Mai 2008 dreißig Schüler, die bei einem Schulausflug auf einem Bauernhof Rohmilch getrunken hatten, schweren Durchfall. Bei vielen dieser Kinder konnten EHEC im Stuhl nachgewiesen werden. Bei zwei Kindern der Gruppe verlief die EHEC-Infektion so schwer, dass sie auf der Intensivstation behandelt werden mussten (Welt *online*, 19.5.2008).

Hauptrisikofaktoren für Infektionen mit EHEC sind der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, insbesondere der Konsum von rohen Lebensmitteln, wie Mett oder Rohmilch (s. o.). Während in den USA Hamburger als Hauptquelle für EHEC-Infektionen gelten, sind in Europa über diesen Verbreitungsweg bisher noch keine Fälle aufgetreten (Karch et al. 1999).

Neben den Lebensmitteln ist jedoch auch der direkte Kontakt zu potentiellen Überträgern als gefährlich anzusehen, wie er häufig in Streichelzoos oder bei Haustieren gegeben ist. Tiere sind hierbei oft Träger ohne an sichtbaren Krankheitssymptomen zu leiden und stellen deshalb eine besondere Gefahrenquelle dar. Vor allem Rinder gelten als Hauptreservoir für EHEC; sie weisen jedoch keine Symptome von HUS auf. Die möglichen Verbreitungswege für EHEC-Infektionen sind in **Abbildung 1** dargestellt.

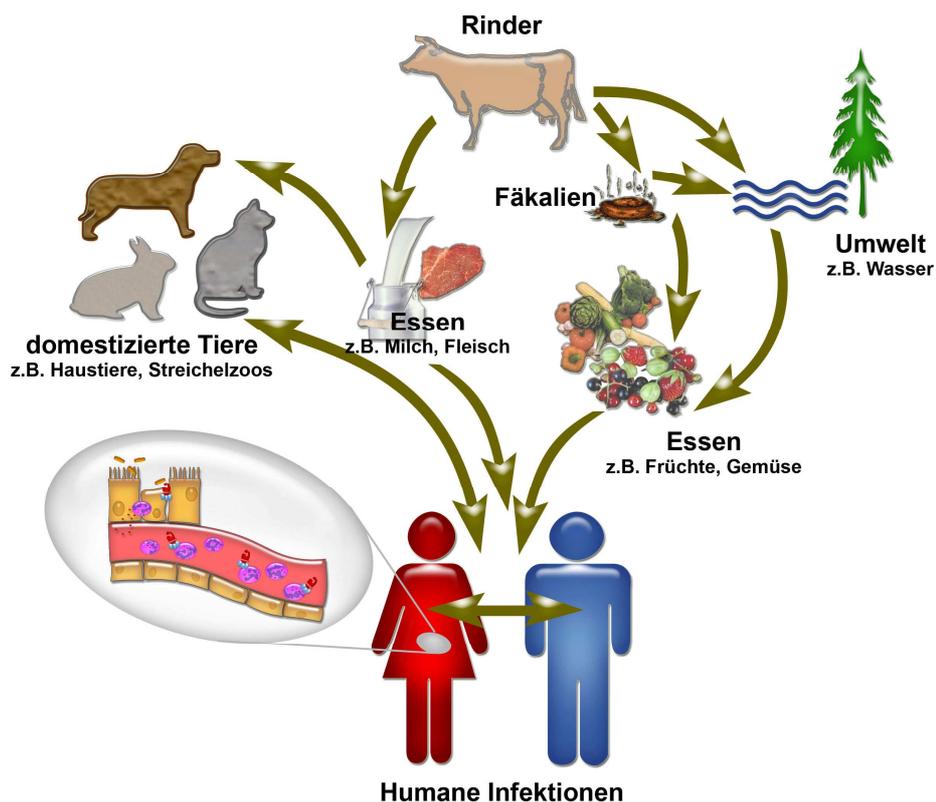


Abbildung 1: Infektionspfade von EHEC. Die Aufnahme von EHEC kann über verschiedene Wege erfolgen. Eine der Hauptquellen stellen hierbei nicht erhitze Lebensmittel dar. Das können Primärprodukte von Trägertieren wie Rohmilch und rohes Fleisch sein oder über Tierfäkalien infiziertes ungekochtes Obst und Gemüse. Über die Einnahme von kontaminiertem Wasser sowie durch den direkten Kontakt mit Trägertieren, wie er häufig in Streichelzoos vorkommt, können ebenfalls Infektionen auftreten. Letztendlich ist auch ein direkter Mensch-zu-Mensch-Übertragungsweg möglich.

4.2 Pathogenitätsfaktoren von EHEC

EHEC besitzen verschiedene Faktoren (vgl. **Abbildung 2**), die ihre hochgradige Pathogenität determinieren. Dabei kann zwischen membranständigen, adhäsiven und sekretierten, proteolytisch aktiven Faktoren unterschieden werden. Die adhäsiven Eigenschaften werden durch Fimbrien wie „Sfp“ (engl: *sorbitol fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded*) oder auch Immunglobuline-bindende Proteine wie „EibG“ (engl: *Escherichia coli immunoglobulin-binding protein G*) beeinflusst. Sie sind dabei für eine Bindung an den Zielorganismus oder die Zielzelle verantwortlich und sorgen somit für eine direkte Wirt-Pathovar-Interaktion. Die sekretierten Faktoren, darunter die hochtoxischen „Shiga Toxine“ (Stx), das hämolytisch wirkende „EHEC-Hämolyisin“ (EHEC-Hly), das zytotoxische „cytolethal distending toxin“ (Cdt) und die proteolytische „Extrazelluläre Serin Protease Plasmid Kodiert“ (EspP) wirken direkt in der Zielzelle und hemmen das Wachstum oder führen direkt zum Zelltod.

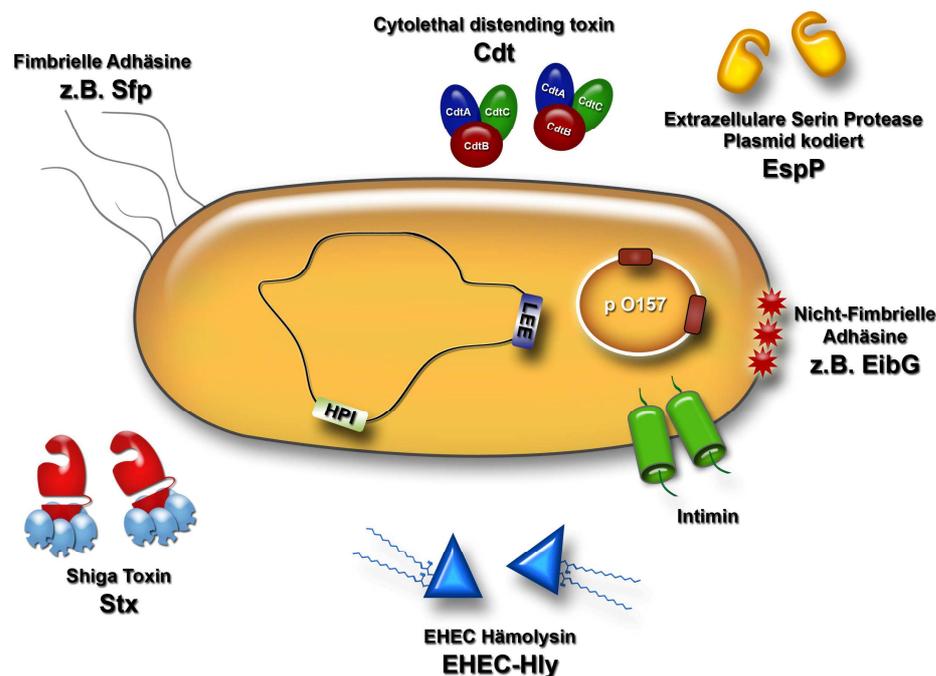


Abbildung 2: Pathogenitätsfaktoren enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC). Schematisches Schaubild eines EHEC mit verschiedenen Pathogenitätsfaktoren. Als sekretierte Virulenzfaktoren sind die Shiga Toxine (Stx), das EHEC-Hämolyisin EHEC-Hly), die Serinprotease EspP und das Cytolethal Distending Toxin (Cdt) dargestellt. Als Adhäsionsfaktoren wirken die membranständigen Fimbrien, wie hier Sfp, und die nichtfimbriischen Proteine, wie z. B. das EibG. Zusätzliches Charakteristikum vieler EHEC sind die chromosomalen Pathogenitätsinseln HPI und LEE, auf der auch der Pathogenitätsfaktor Intimin kodiert ist sowie die extrachromosomalen Plasmide (hier **pO157**).

Viele Pathogenitätsfaktoren sind chromosomal in sogenannten Pathogenitätsinseln (PI) kodiert. Die bekanntesten PI von *E. coli* sind der *locus of enterocyte effacement* (LEE) und die *high pathogenicity island* (HPI) (Karch et al. 1999). Andere befinden sich auf extrachromosomalen ringförmigen DNA-Abschnitten, sogenannten Plasmiden. Im nachfolgenden Schaubild (**Abbildung 2**) ist das Plasmid pO157 eingezeichnet, welches bei Vertretern von *E. coli* O157 auftritt und unter anderem für den Pathogenitätsfaktor Intimin kodiert.

4.2.1 Shiga Toxin (Stx)

Erst 74 Jahre nach der Klassifizierung von *Shigella dysenteriae* (Shiga 1898) konnte die Ursache seiner Pathogenität aufgeklärt werden, nachdem es gelungen war, ein Enterotoxin aus *Shigellen* zu isolieren, das als Shiga Toxin bezeichnet wurde (Keusch 1972). Kurze Zeit später jedoch wurden Shiga Toxine auch in anderen Spezies, wie z. B. in *E. coli* entdeckt. Häufig verwendete Synonyme sind Verotoxine oder Shiga-like Toxine. Sie gelten als Hauptpathogenitätsfaktoren in EHEC und werden deshalb in der Routinediagnostik standardmäßig bestimmt. Man unterteilt sie in zwei Hauptgruppen: Typ 1 Shiga Toxine (Stx1) und Typ 2 Shiga Toxine (Stx2). Innerhalb dieser gibt es weiterhin verschiedene Subtypen: Stx1, Stx1c und Stx1d beim Typ 1, sowie Stx2, Stx2c, Stx2c2, Stx2d, Stx2d_{activatable}, Stx2e und Stx2f beim Typ 2. Sie unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrer Gensequenz, sondern teilweise auch in ihrem Rezeptor-Bindungsverhalten und in ihrer Krankheitsbildausprägung. Die nachfolgende **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die verschiedenen Toxine und deren assoziiertes Krankheitsbild.

Tabelle 1: Shiga Toxine und deren assoziiertes Krankheitsbild.

Stx Subtyp	Krankheitsbild ¹	Referenz
Stx1	A, D, BD, HUS	Friedrich 2002, Gerber 2002, Orth 2007
Stx1c	A, D, BD, HUS	Zhang 2002, Friedrich 2003, Orth 2007
Stx1d	D	Kuczius 2004
Stx2	D, BD, HUS	Banatvala 2001, Friedrich 2002, Gerber 2002, Jenkins 2003, Tozzi 2003, Brooks 2005, Orth 2007, Mellmann 2008
Stx2c	D, BD, HUS	Friedrich 2002, Gerber 2002, Jenkins 2003, Orth 2007
Stx2c2	D	Jelacic 2003
Stx2d	A, D	Pierard 1998, Friedrich 2002, Jenkins 2003, Orth 2007
Stx2d _{activatable}	D, BD, HUS	Beutin 2004, Prager 2005, Bielaszewska 2006, Orth 2007
Stx2e	A, D	Friedrich 2002, Sonntag 2005, Orth 2007,
Stx2f	D	Jenkins 2003, Isobe 2004, Sonntag 2005, Seto 2007, van Duynhoven 2008

¹A: Asymptomatische Ausscheider, D: wässrige Diarrhöe, BD: blutige Diarrhöe, HUS: Hämolytisch Urämisches Syndrom

Bis zu einem gewissen Grad kann über die Bestimmung des Shiga Toxin-Subtyps beim Patienten somit eine Risikoabschätzung durchgeführt und ein wahrscheinlicher Krankheitsverlauf prognostiziert werden.

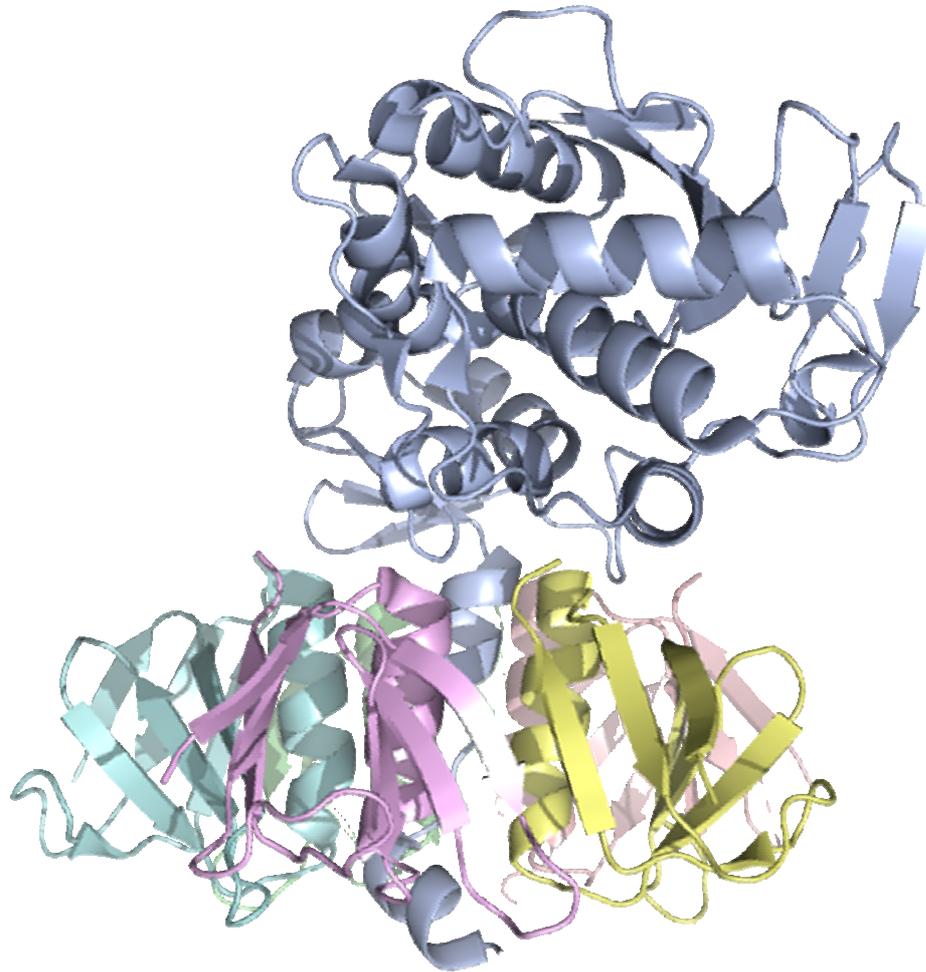


Abbildung 3: Bänderdarstellung des Bakteriophagen-kodierten (BP 933W) Shiga Toxin 2. In Blau dargestellt ist die A-Untereinheit; in Türkis, Rot, Gelb, Rosa und Grün die B-Untereinheiten (Quelle: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Shiga Toxine gehören zu den AB₅-Toxinen, zu welchen auch das Pertussis-Toxin und das Cholera-Toxin zählen (Merritt und Hol 1995). Sie sind bifunktional und besitzen eine enzymatisch aktive A-Untereinheit und 5 identische, zu einem Pentamer zusammengelagerte B-Untereinheiten, welche für die lektinartige Bindung an die Glykosphingolipid(GSL)-Rezeptoren verantwortlich sind. Im Fall von Stx sind dies Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer) (siehe **Abbildung 3-6** sowie **Abbildung 12** für den Stx Mechanismus).

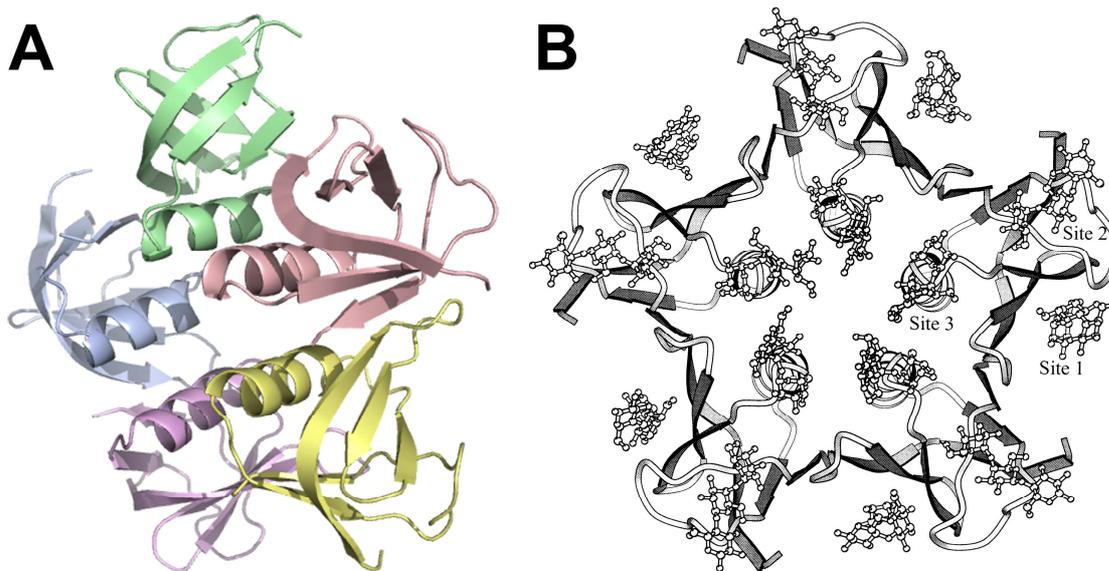


Abbildung 4: Bakteriophagen-kodierte Shiga Toxin 1 B-Untereinheiten (BP 933W). (A) Bänderdarstellung des B-Pentamers von Stx1 mit α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen in einer 3D-Projektion. (B) Vereinfachte (ohne α -Helices) Bänderdarstellung der B-Untereinheiten vom Stx1 mit seinen Rezeptorbindestellen. Jede B-Untereinheit besitzt drei verschiedene Bindestellen (*Site 1-3*) für den Glykosphingolipidrezeptor, also *in summa* 15. *Site 1* wird durch eine Furche zweier benachbarter B-Untereinheiten gebildet und wirkt hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen am Phe₃₀. Die fünf *Sites 2* bilden im Gegensatz zu *Site 1* und *Site 3* stärkere Wasserstoffbrückenbindungen aus und gelten deshalb als Hauptbindestellen von Stx. *Site 3* wird wiederum hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Dabei spielt Trp₃₄ eine dominierende Rolle bei der Interaktion mit dem Rezeptoroligosaccharid (Quelle: A; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, B, Ling et al 1998).

Die B-Untereinheiten besitzen 3 verschiedene Bindestellen mit jeweils unterschiedlichen Wirkmechanismen. Die Interaktion der Bindestelle 1 (*Site 1*, vgl. **Abbildung 4**) erfolgt hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem terminalen Galaktosering des Hauptrezeptors Gb3Cer und Phe₃₀ bei Stx1 bzw. Trp₂₉ bei Stx2 aus (Anmerkung: durch Unterschiede in den Datenbankeinträgen bezüglich des potentiellen Signalpeptids kann es beim Stx2 auch Trp₃₀ lauten). *Site 2* gilt durch seine stark ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der internen Galaktose des Rezeptoroligosaccharids und diversen Aminosäuren (Phe₃₀, Thr₃₁, Gly₆₂, Ser₆₄ bei Stx1) als Hauptbindestelle der Stxs. Der Rezeptor ist in dieser Bindestelle parallel zum Protein angeordnet und ermöglicht dadurch die Ausbildung einer Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Interaktion zwischen Oligosaccharidrezeptor und Protein stabilisieren. Die dritte Bindestelle, *Site 3* zeichnet sich wiederum durch wenige Wasserstoffbrückenbindungen und dafür zahlreichere hydrophobe

Wechselwirkungen aus. Diese werden in erster Linie durch Trp₃₄ beim Stx1 und Trp₃₃ beim Stx2 ausgeprägt (Ling et al. 1998, Fraser et al. 2004). Durch Elektrospray Massenspektrometrieexperimente konnte gezeigt werden, dass sich in der Tat erst die Bindungen an *Site 2* ausbilden und eine Bindung an die restlichen 10 Rezeptor-Stellen (je 5 an *Site 1* und 3) erst nach vollständiger Besetzung der Hauptbindestellen erfolgt (Kitova et al. 2001, Kitova et al. 2007).

Die A-Untereinheit von Stx ist ca. 32 kDa und die jeweiligen B-Untereinheiten ca. 7,5 kDa groß (vgl. **Abbildung 5**). Die A-Untereinheiten der Toxine besitzen eine Disulfidbrücke, die zur Ausprägung einer Schleife in der Tertiärstruktur der Proteine führt. Innerhalb dieses sogenannten Loops befindet sich die Konsensussequenz -R-X-X-R- für die Protease Furin (R = Arginin, X = jede beliebige Aminosäure). Diese spaltet die A-Untereinheit in eine ca. 27,5 kDa große A1- und eine ca. 4,5 kDa große A2-Untereinheit, was besonders für die zytotoxische Aktivität der Shiga Toxine von Bedeutung ist (Garred et al. 1995, Kurmanova et al. 2007, Lea et al. 1999, Samuel et al. 1994). Umstritten ist allerdings, ob die Spaltung der A-Untereinheit durch Furin bereits in der Plasmamembran, den frühen Endosomen oder erst im Trans-Golgi-Netzwerk stattfindet (vgl. **Abbildung 6**).

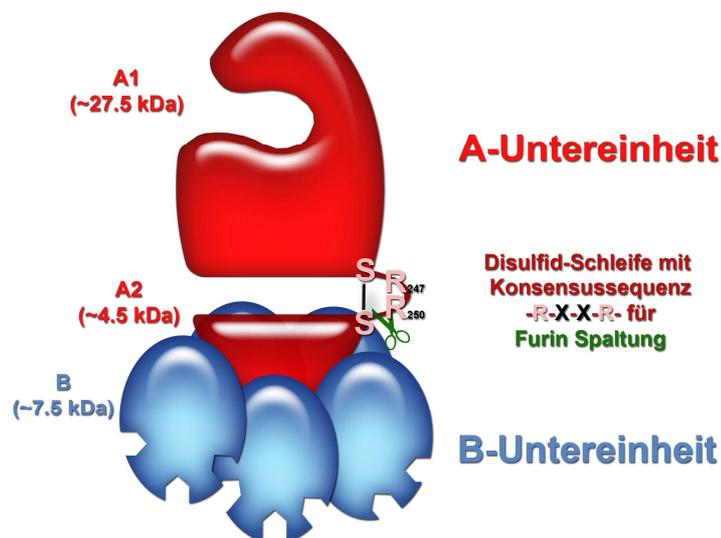


Abbildung 5: Schemazeichnung des Shiga Toxins. In Rot dargestellt ist die A-Untereinheit (ca. 32 kDa) des Shiga Toxins mit der Disulfid-Schleife zwischen den Cysteinen C₂₄₂ und C₂₆₁. Innerhalb dieser beiden Sub-Untereinheiten A1 und A2 verbindenden Loops befindet sich die Konsensussequenz -R-X-X-R- für die Protease Furin. Die proteolytische Spaltung findet C-terminal am Arginin R₂₅₀ statt. In Blau dargestellt sind die fünf identischen, zu einem Pentamer zusammengelagerten, B-Untereinheiten die je 3 Rezeptor-Bindedomänen (je ca. 7,5 kDa) besitzen. Für Stx2 gilt, dass sich die Disulfid-Schleife zwischen den Cysteinen C₂₄₁ und C₂₆₀ befindet und die Spaltung mittels Furin findet an R₂₄₉ statt.

Internalisierte Toxine werden retrograd über die frühen Endosomen und das Trans-Golgi-Netzwerk, über den trans-Golgi- und den cis-Golgi-Apparat bis zum Endoplasmatischen Retikulum (Johannes und Decaudin 2005, Sandvig und dvan Deurs 2005, Paton und Paton 2006) transportiert (vgl. **Abbildung 6**). Nach Spaltung der A-Untereinheit in A1 und A2 sowie dem Transfer der A1-Untereinheit ins Cytosol wirkt diese dort als rRNA-N-Glykosidase und spaltet spezifisch ein Adenin der ribosomalen 28 S RNA (Lingwood 1996). Dies führt zur Inhibition der Proteinbiosynthese und damit zum Zelltod.

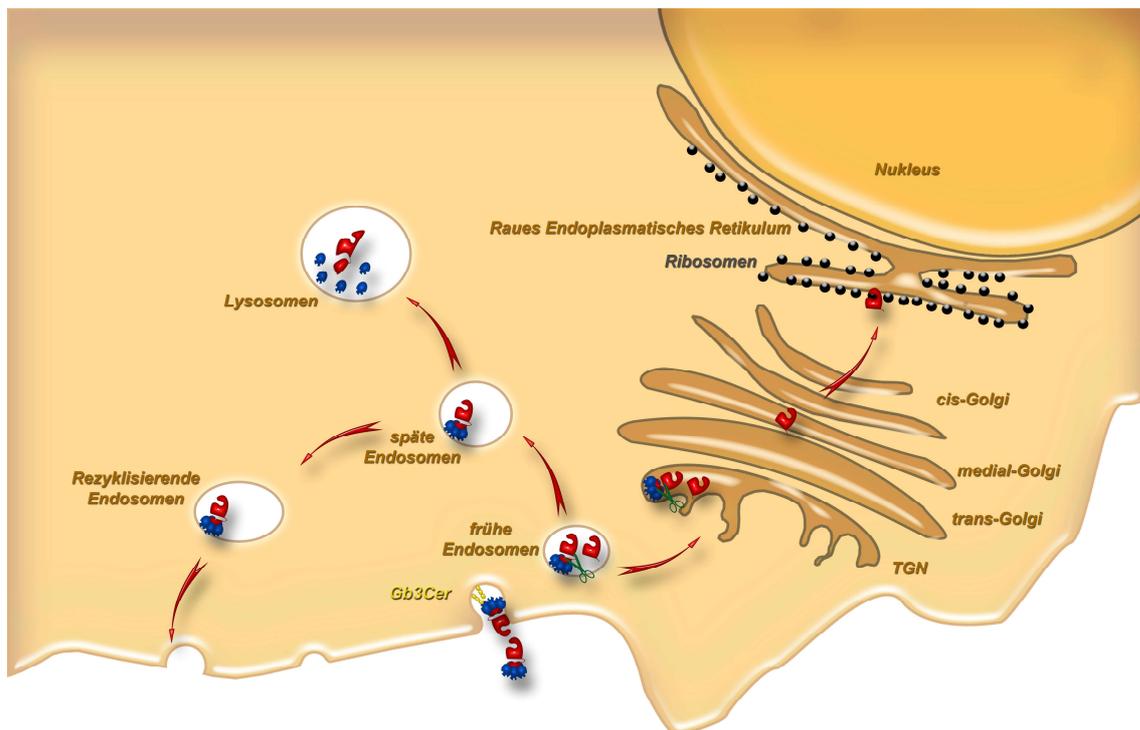


Abbildung 6: Retrograder Transport von Stx in die Zelle. Die Stxs binden über ihre B-Untereinheiten an membranständige Rezeptoren und durchlaufen eine Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei gelangen sie über frühe Endosomen, das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), den trans-, medialen und cis-Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum. An den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums findet die die Proteinbiosynthese inhibierende Abspaltung eines Adenins in der 28 S RNA der Ribosomen durch die A1-Untereinheit des Stx statt. Als nicht-zytotoxische Transportmechanismen, die auf Resistenzmechanismen der Zellen beruhen, sind zum Einen der Weitertransport der Toxine über die frühen und die späten Endosomen zu den Lysosomen zu sehen, wo die Toxine degradiert und somit inaktiviert werden, sowie zum Anderen die Ausschleusung der Toxine über rezyklierende Endosomen.

Neuere Untersuchungen (Römer et al. 2007) haben gezeigt, dass Shiga Toxine selbst Invaginationen induzieren und somit ihren Transport in die Membran direkt beeinflussen können (vgl. **Abbildung 6**). Steht eine Membran durch das Vorhandensein

von vielen ungesättigten Fettsäuren bereits unter Spannung, kann die Bindung der Stx B-Untereinheiten an die ebenfalls in der Membran vorhandenen Rezeptoren zur vollständigen Invagination und somit zur Vakuolenbildung in die Zelle hinein führen. Bei diesem Prozess spielen Lipid Rafts und im Speziellen die sogenannten Caveolae eine wichtige Rolle, da diese stark mit Glykosphingolipiden assoziiert sind (Smith et al. 2006). Die Konzentration an Rezeptoren ist hier viel höher als in der umliegenden Umgebung, wodurch die Toxine, die jeweils über 15 Bindedomänen besitzen, an wesentlich mehr Rezeptormoleküle binden können. Dies führt zu der beschriebenen Spannungserhöhung und zur vollständigen Invagination der Toxine in die Zelle.

Verschiedene Zelltypen weisen Shiga Toxin-Resistenzen auf, welche durch unterschiedliche Mechanismen entstehen können. Zum Einen kann die Bindung und der Transport in die Zelle durch das Fehlen von Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche vollständig unterbunden sein, zum Anderen können die Toxine über die frühen Endosomen zu den späten Endosomen und schließlich den Lysosomen transportiert werden, wo das Stx degradiert und somit inaktiviert wird. Außerdem ist es möglich, dass Stx über sogenannte rezyklisierende Endosomen wieder aus der Zelle heraustransportiert wird (vgl. **Abbildung 6**).

4.2.2 EHEC-Hämolyisin (EHEC-Hly)

Das EHEC-Hämolyisin ist ein RTX-Toxin (engl.: *repeats in toxin*) und gehört zur Klasse der porenbildenden Zytolysine. Es handelt sich um ein plasmidkodierte und ca. 107 kDa großes Protein, das eine hohe Homologie zum α -Hämolyisin der uropathogenen *E. coli* aufweist (Welch und Pellett 1988, Schmidt et al. 1996). Das EHEC-hly Operon besteht aus vier Genen (EHEC-*hlyA* – *hlyD*) und liegt auf dem großen Virulenzplasmid von *E. coli* O157:H7. Dabei kodiert *hlyA* für das sekretierte Hämolyisin, während *hlyB* und *hlyD* den Transport von HlyA beeinflussen und HlyC schließlich HlyA posttranslational acyliert. Das von *hlyA* kodierte Protein besitzt 998 Aminosäuren (AS) bei einem Molekulargewicht von 107,034 kDa.

4.2.3 Extrazelluläre Serin Protease plasmidkodiert (EspP)

Der Virulenzfaktor EspP ist eine Serinprotease mit Autotransporterfunktion (Pohlner et al. 1987, Brunder et al. 1997), die den humanen Faktor V spaltet und somit eine wichtige Rolle in der Inaktivierung der Blutgerinnungskaskade spielt, insbesondere bei Schleimhautblutungen während EHEC-Infektionen (Brunder et al. 1997, Dutta et al. 2002). Das EspP Holotoxin hat ein Molekulargewicht von 142 kDa groß und besitzt eine ca. 104 kDa große *passenger* Domäne, welche von den EHEC sekretiert wird. Neben dem Faktor V spaltet EspP zahlreiche weitere Moleküle, darunter porcines Pepsin A und humanes P-Selektin (Brockmeyer in Vorbereitung). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die *passenger* Domäne des EspP verwendet, deren Aminosäuresequenz aus 968 AS bei einem Molekulargewicht von 105,439 kDa bestand. Eine schematische Bänderdarstellung der β -Domäne von EspP α zeigt **Abbildung 7**.

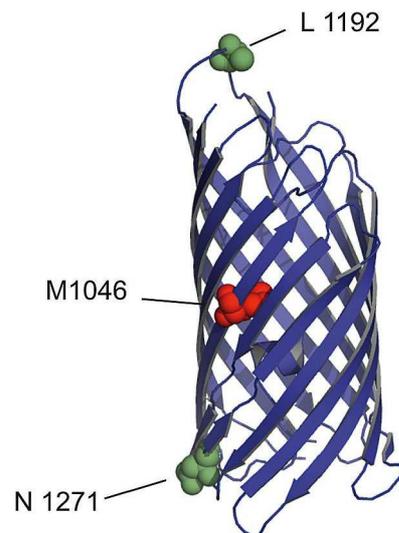


Abbildung 7: Bänderdarstellung der β -Domäne von EspP α aus *E. coli* EDL 933. Dargestellt ist die β -Domäne von EspP α mit drei eingezeichneten von Herr Brockmeyer während seiner Dissertation durchgeführten Punktmutationen. Mit freundlicher Genehmigung aus der Dissertationsschrift von Herrn Jens Brockmeyer übernommen.

4.2.4 Cytolethal Distending Toxin (Cdt)

Das Cdt-Holotoxin besteht aus den drei Untereinheiten CdtA, CdtB und CdtC. Während das CdtB über eine DNase- und Phosphatase-Aktivität verfügt und für die zytotoxische Wirkung verantwortlich ist (Shenker et al. 2007), wird bei den beiden Untereinheiten A und C lediglich eine Funktion bei der Rezeptorbindung vermutet. Ob dieses ein Zusammenwirken beider Einheiten erfordert oder aber jede allein bereits Rezeptorbindende Eigenschaften besitzt, ist bis heute unbekannt. Über das Cdt aus anderen Spezies, wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, gibt es bereits wesentlich ausführlichere Studien (Cao et al. 2008, Boesze-Battaglia et al. 2006, McSweeney und Dreyfus 2005, Mise et al. 2005) als über das aus *E. coli* isolierte Cdt (Friedrich et al. 2006, Janka et al. 2003). Cdt kann in Zellen einen G₂/M-Arrest auslösen und so eine Zellproliferation verhindern (Bielaszewska et al. 2005). Das CdtA besitzt 258 Aminosäuren bei einer Größe von 27,845 kDa, CdtB 269 Aminosäuren bei 29,753 kDa und CdtC 181 AS bei 19,974 kDa (Bielaszewska et al. 2004). Einen Überblick über die einzelnen räumlichen Strukturen der drei Cdt-Untereinheiten am Beispiel von Cdt aus *Haemophilus ducreyi* gibt **Abbildung 8** (Nesic et al. 2004).

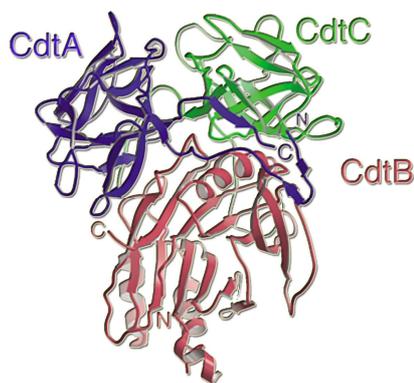


Abbildung 8: Bänderdarstellung der drei Untereinheiten von Cdt aus *H. ducreyi*. Dargestellt sind die drei Untereinheiten CdtA (blau), CdtB (rot) und CdtC (grün) in ihrer Bänderdarstellung mit C- und N-Terminus (Quelle: modifiziert nach Nesic et al. 2004).

4.2.5 Adhäsive Virulenzfaktoren

Adhäsine spielen bei der Virulenz eines pathogenen Organismus' eine entscheidende Rolle, da sie die Bindung an den Zielorganismus bzw. die Zielzelle vermitteln. Im Falle der EHEC findet diese Adhäsion-vermittelte Bindung der Bakterien an die Darmmukosa statt und führt dort zu schweren Infektionen. Zu den Adhäsinen zählen eine Reihe von Proteinen, die auf der Pathogenitätsinsel LEE (engl.: *locus of enterocyte effacement*) lokalisiert sind. Als Beispiele für diese Virulenzfaktoren werden in den folgenden Kapiteln die Sfp-Fimbrien und das EibG aus *E. coli* näher erläutert.

4.2.5.1 Fimbrienadhäsine

Zu den Fimbrienadhäsinen in EHEC gehören die Lpf- (engl.: *long polar fimbriae*) (Doughty et al. 2002), die Sfa- (engl.: *S fimbriae major subunit*) (Spears et al. 2006) und die Sfp-Fimbrien (engl.: *sorbitol fermenting EHEC O157 fimbriae, plasmid-encoded*), welche ausschließlich mit dem Sorbitol-fermentierenden Stamm O157:NM assoziiert sind (Friedrich et al. 2004) und entscheidenden Einfluss bei der Adhäsion dieser Stämme an Zellen haben (Müsken et al. 2008). Zum Sfp-Gencluster gehören die sechs Untereinheiten *sfpA*, *sfpH*, *sfpC*, *sfpD*, *sfpJ* und *sfpG*, wobei *sfpA* die Hauptuntereinheit darstellt. Diese Gene sorgen für die Expression von Fimbrien, welche eine Mannose-resistente Hämagglutination herbeiführen können. *SfpA*, welches in dieser Arbeit näher untersucht werden soll, besteht aus 174 AS und ist 17,93 kDa groß.

4.2.5.2 Immunglobulin-bindende Proteine

Zentraler Faktor in der Immunantwort bei der Abwehr von pathogenen Erregern ist die Produktion von Immunglobulinen (Ig) gegen Fremdorganismen. Sie sind in der Lage, spezifische Epitope oder auch Antigene zu binden und zu neutralisieren. Durch eine spezifische Bindung der Antikörper wird unter anderem die Aufnahme und Zerstörung der Fremdorganismen durch Makrophagen erleichtert und gefördert. So haben viele Bakterienarten wirksame Strategien entwickelt, um genau diesen Mechanismus zu unterbinden und zu umgehen. Eine Möglichkeit besteht in der proteolytischen Spaltung der Immunglobuline und damit ihrer vollständigen Inaktivierung. Diese Strategie verfolgt beispielsweise das Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* (van Ulsen und Tommassen 2006). Eine andere ist die Bindung der Antikörper durch Bakterienproteine und deren damit verbundene vollständige Blockierung. Das bekannteste Beispiel für

diesen Wirkmechanismus ist das Protein A von *Staphylococcus aureus* (Forsgren und Sjöquist 1966).

EibG gehört zur Familie der Eib-Proteine (*Escherichia coli* immunoglobulin-binding proteins), zu der sechs Proteine zählen: EibA, C, D, E, F und G (Lu et al. 2006, Sandt und Hill 2000, Sandt und Hill 2001). EibG ist ebenso wie auch Protein A in der Lage, Immunglobuline zu binden und zu inaktivieren. Das EibG befindet sich in der äußeren Membran von *E. coli* und besitzt 508 AS bei 54,101 kDa Größe.

4.3 Zelloberflächenrezeptoren

Initialschritt einer Infektion mit pathogenen Bakterien ist die Bindung der Erreger oder ihrer Pathogenitätsfaktoren an Zielzellen. Dabei spielen Oberflächenrezeptoren auf den Zellen eine entscheidende Rolle. Diese können von unterschiedlichster Art sein. Eine wichtige Rolle unter ihnen nehmen Oligosaccharid-Strukturen ein, die Teil von Glykoproteinen, Glykosphingolipiden oder GPI-Anker-Proteinen sind. Der schematische Aufbau einer Lipiddoppelschicht mit typischen Komponenten der Plasmamembran ist **Abbildung 9** zu entnehmen.

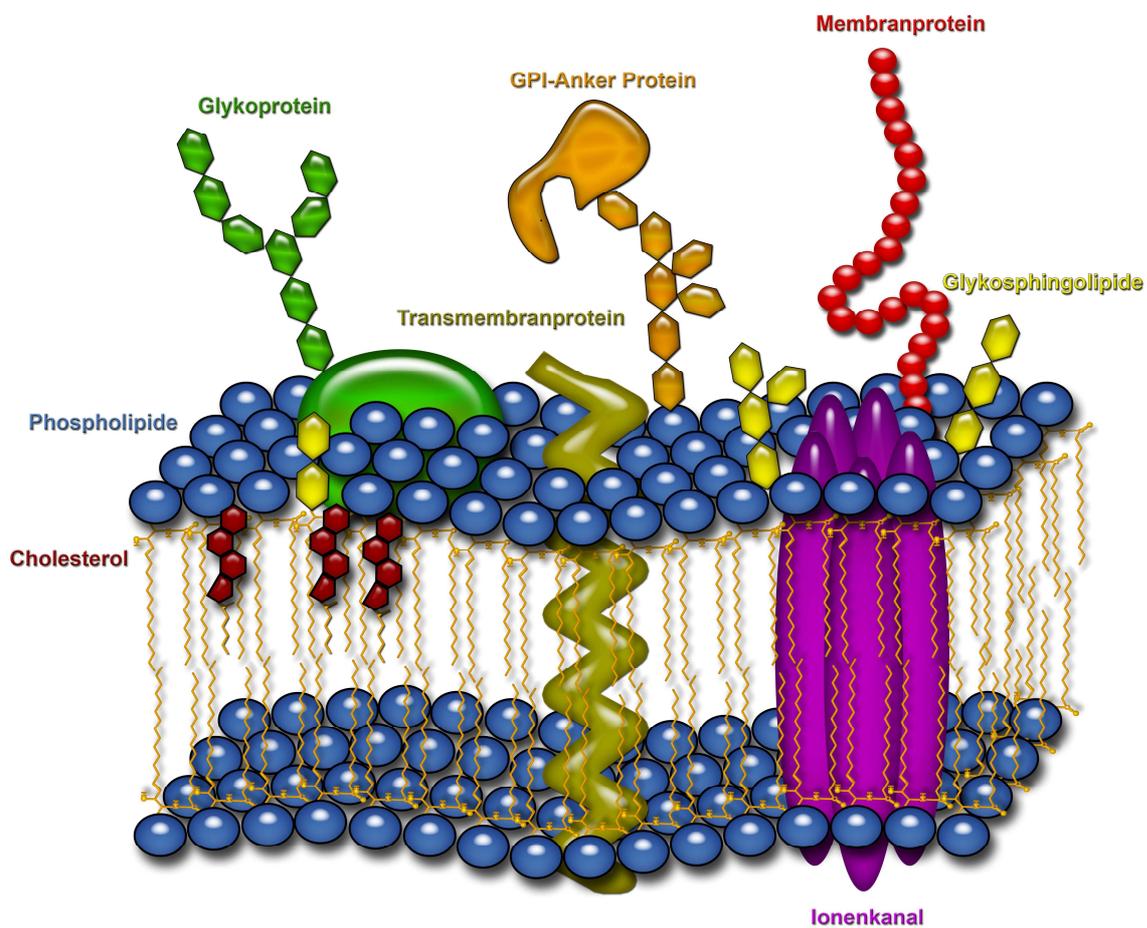


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Plasmamembran. Dargestellt ist der schematische Aufbau einer Phospholipiddoppelschicht. Ein wichtiger Bestandteil der Membran sind die in Blau und Gelb dargestellten namensgebenden Phospholipide. Als potentielle Rezeptoren für Fremdorganismen wie Bakterien kommen verschiedene Substanzklassen in Frage. Darunter fallen Transmembranproteine (Dunkelgelb), GPI-Anker Proteine (Orange), Glykoproteine (Grün), und Glykosphingolipide (Gelb).

Wie bereits in **Kapitel 4.2.1** beschrieben besitzen Stx die Fähigkeit, durch die Membran zu gelangen und im Anschluss in der Zelle ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Für die Endozytose sind Mikrodomänen, darunter die sogenannten Caveolae, als supramolekulare Strukturen mit charakteristischer Biomolekülverteilung in der Plasmamembran besonders wichtig. Diese Caveolae gelten als Glykolipid-assoziiert und weisen insofern sehr hohe Glykolipiddichten mit unter anderem auch den Stx-Rezeptoren auf (vgl. **Abbildung 10**). Zusätzlich sind Caveolae besonders reich an Cholesterin, welches eine verstärkte Stx Rezeptorbindung verursacht (Nakajima et al. 2001).

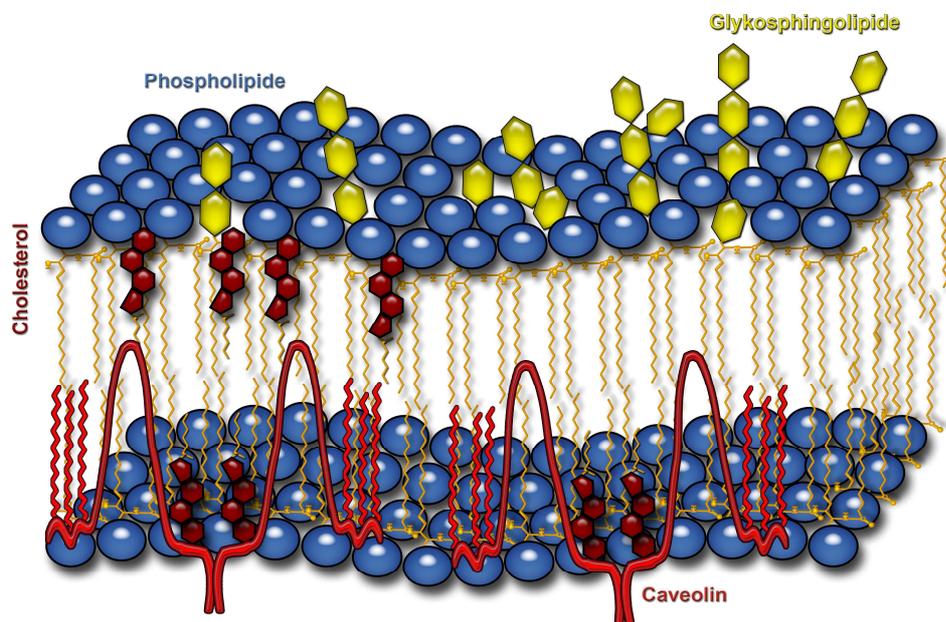


Abbildung 10: Ausschnitt aus einer Caveolae-Struktur. Caveolae sind Membranregionen, die häufig mit Glykosphingolipiden (Gelb) assoziiert sind und deshalb als Target für GSL-bindende Organismen oder Toxine von entscheidender Bedeutung sind. Namensgebend für die Caveolae ist das Protein Caveolin (Hellrot).

4.3.1 Glykosphingolipide (GSL)

Glykosphingolipide (GSL) sind amphipathische Moleküle bestehend aus einem hydrophilen Saccharidpart und einem lipophilen Kohlenwasserstoffanteil. Der lipophile Bereich wird als Ceramid bezeichnet und besteht bei Säugern größtenteils aus dem Aminoalkohol Sphingosin und einer über eine Amidbindung verknüpften Fettsäure mit variierender Kettenlänge, üblicherweise zwischen 14 und 26 C-Atomen. Das Ceramid ist über eine glykosidische Bindung mit dem hydrophilen Oligosaccharid verbunden. Je nach Abfolge und Anzahl der Zucker sowie der Art der Verknüpfung unterscheidet man bei den GSL verschiedene Strukturfamilien.

Dabei teilt man die GSL grundsätzlich in zwei Hauptgruppen ein, die neutralen GSL (nGSL), welche ausschließlich Neutralzucker im Saccharidpart enthalten, und die Ganglioside, welche neben den Neutralzuckern auch noch negativ geladene Sialinsäuren besitzen, wie z.B. die *N*-Acetyl-Neuraminsäure. Die häufigsten in GSL vorkommenden Monosaccharide sind Glukose (Glc), Galaktose (Gal), *N*-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc), *N*-Acetyl-Galaktosamin (GalNAc), 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) und Fukose (Fuc).

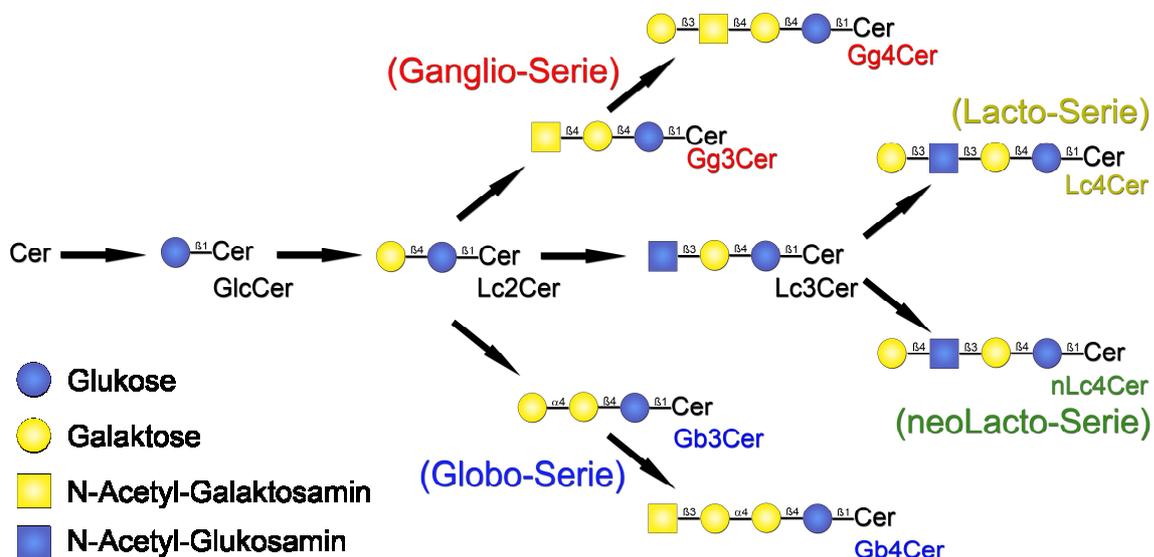


Abbildung 11: Syntheschema der nGSL. Dargestellt ist der Synthesepfad der nGSL über das Glukosylceramid (GlcCer) und das Laktosylceramid (Lc2Cer). Die verschiedenen Serien sind in Blau (Globo-Serie), Rot (Ganglio-Serie), Grün (Neolacto-Serie) und Gelb (Lacto-Serie) in Kullerndarstellung skizziert.

Bei den nGSL, auf denen der Fokus dieser Arbeit liegt, unterscheidet man vier verschiedene Serien: die Laktoserie (Lc), die Neolaktoserie (nLc), die Ganglioserie (Gg) und die Globoserie (Gb). Ausgehend vom Glukosylceramid (GlcCer) und dem Laktosylceramid (Lc2Cer), welche Vorläuferstrukturen sind, werden die GSL durch verschiedene Glykosyltransferasen synthetisiert und je nach Sequenz und Art der Verknüpfung der Zucker einer bestimmten Serie zugeordnet. Die genauen Strukturen sind in **Abbildung 11** dargestellt. Insbesondere sei an dieser Stelle auf die nGSL der Globoserie hingewiesen, zu denen die beiden Rezeptoren für Stx, Gb3Cer und Gb4Cer, gehören. Im Detail sind die Strukturen in **Abbildung 12** aufgeführt.

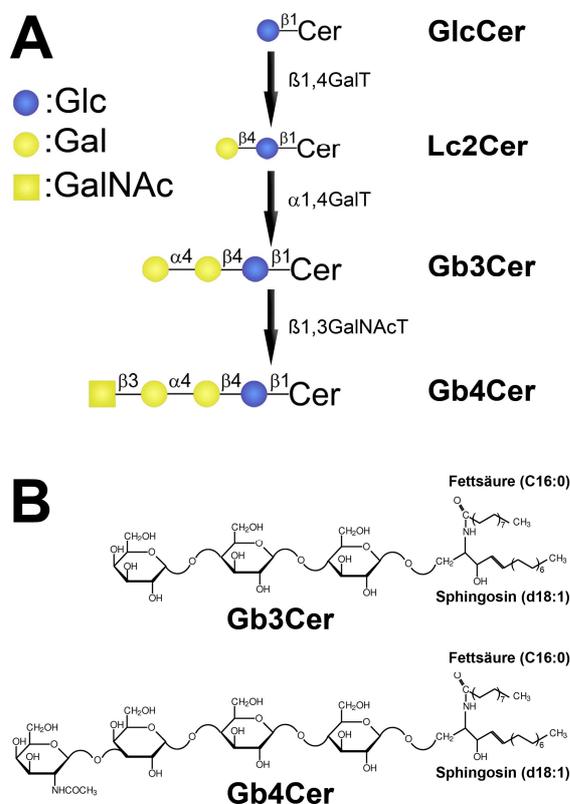


Abbildung 12: Synthesepfad der nGSL der Globoserie und Detailstrukturen der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer. (A) Detailliertes Syntheschema der nGSL der Globoserie über das Glukosylceramid (GlcCer), Laktosylceramid (Lc2Cer), Globotriaosylceramid (Gb3Cer) bis zum Globotetraosylceramid (Gb4Cer). Als Transferasen für die Synthese bis zum Gb4Cer fungieren sequenziell die β 1,4-Galaktosyltransferase (β 1,4GalT), die α 1,4-Galaktosyltransferase (α 1,4GalT) und die β 1,3-*N*-Acetyl-Galaktosaminyltransferase (β 1,3GalNAcT). (B) Detailstruktur der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer.

Die Nomenklatur der GSL erfolgt nach den Regeln der *Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)*, heute *Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB) Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)* (Chester 1998).

4.4 Detektionsverfahren

Um die Strukturen der Pathogenitätsfaktoren zu analysieren und darüber hinaus ihre Bindungseigenschaften zu ihren Rezeptoren zu charakterisieren, müssen verschiedene Detektionsverfahren angewendet werden. Dabei wird im Folgenden der Schwerpunkt auf die Vernetzung der immunchemischen mit den massenspektrometrischen Techniken gelegt, um einen möglichst umfassenden Überblick über die Eigenschaften der Pathogenitätsfaktoren zu erhalten. Eine mögliche Form der Quervernetzung von Analysetechniken ist es, immunchemische Verfahren, die einen direkten Hinweis auf Bindungseigenschaften liefern, mit massenspektrometrischen Verfahren zu koppeln, die eine genaue strukturelle Charakterisierung ermöglichen. Diese Techniken werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert und beschrieben.

4.4.1 Immunchemische Nachweismethoden

Antikörperbasierte Nachweismethoden werden eingesetzt, um die Bindungen zweier oder mehrerer Biomoleküle zu bestimmen. Dabei gibt es verschiedene Verfahren und Färbemethoden. Die in dieser Arbeit verwendeten Detektionsmethoden sind die Immunfluoreszenzmikroskopie, in der die Bindungen über AK mit Fluoreszenzfarbstoff-Markierung auf Zellkulturen direkt nachgewiesen werden, und die Immundetektion mittels Overlay-Assay, in welcher eine Bindung von AK oder Toxinen an GSL-Strukturen nach chromatographischer Trennung mittels Enzym-gekoppelter Antikörper über ein präzipitierendes Substrat gezeigt werden kann.

4.4.2 Massenspektrometrische Nachweistechiken

Die Massenspektrometrie ist ein Analyseverfahren, mit dem exakte Massen von Molekülonen im Hochvakuum bestimmt werden können. Durch verschiedene Fragmentierungsverfahren können darüber hinaus strukturelle Informationen über die Analyten gewonnen werden.

Ein Massenspektrometer besteht aus drei Grundkomponenten: einer Ionenquelle, in der die Analytmoleküle in die Gasphase gebracht und ionisiert werden, einem Analysator, welcher die Substanzen ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) entsprechend auftrennt, und einem Detektor, der das Auftreten von Molekülonen in auswertbare Signale umwandelt.

In dieser Arbeit wurden zwei sanfte Ionisierungsarten verwendet, die Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI, Karas und Hillenkamp 1988) und die Elektrospray Ionisation (ESI, Fenn et al. 1989). Als Analysatoren kamen Quadrupole (Q) und Flugrohre (TOF, engl: *time-of-flight*) zum Einsatz, als Detektoren ein Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV) und eine Mehr-Kanal-Platte (MCP, engl: *multichannelplate*). Genauere Informationen sind dem **Kapitel 6.6** im Material und Methodenteil zu entnehmen.

4.5 Endothelzellen, fötales Kälberserum und humanes Plasma

Entscheidend für eine genaue Charakterisierung der Pathogenitätsfaktoren und ihrer Wirkung ist die Auswahl an geeigneten Testsystemen. Dazu gehören zum Einen die bereits in **Kapitel 4.4** erwähnten und im Detail im Material und Methodenteil beschriebenen Detektionsverfahren, zum Anderen aber auch Zielzellen, anhand derer die Wirkung untersucht werden kann.

4.5.1 Endothelzellen

Da EHEC eine starke Schädigung des Endothels verursachen, wurden als Modellzelllinien zur Untersuchung auf Reaktivitäten mit Stx zwei Endothelzelllinien verwendet: eine mikrovaskuläre, die *human brain microvascular endothelial cells* (HBMECs), und eine makrovaskuläre, die EA.hy 926 Zellen (vgl. **Kapitel 6.1.1**).

4.5.2 Fötales Kälberserum (FCS)

Zelllinien werden häufig mit Plasma oder Serum kultiviert, um wichtige für ein schnelles Wachstum ausschlaggebende Nährstoffe und Wachstumsfaktoren in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Diese Vollseren sind jedoch nur in den seltensten Fällen in Gänze charakterisiert, so dass ihre Inhaltsstoffe häufig nicht definiert sind. Da jedoch bereits mehrfach gezeigt wurde, dass Zellen GSL aus ihrer Umgebung aufnehmen können, wurde FCS in dieser Arbeit auf die exakte GSL-Zusammensetzung untersucht (vgl. **Kapitel 6.1.2**).

4.5.3 Humanes Plasma

Dass GSL und Stx-Rezeptoren auf Endothel und Epithel vorkommen, ist hinreichend bekannt. Ebenso wurde vielfach gezeigt, dass Stx-produzierende *Escherichia coli* (STEC) zwar Darmpathovaren sind, eine Hauptschädigung jedoch in der Niere stattfindet. Bis heute ist der Transport der Shiga Toxine zu den Zielzellen noch unklar. Wie gelangt Stx vom Darm zur Niere und verursacht die Endothelzellen-schädigende Wirkung? Als Beitrag zur Klärung der Frage wurde in dieser Arbeit humanes Plasma untersucht, um festzustellen, ob und in welchen Mengen Stx-Rezeptoren in humanem Plasma vorkommen (vgl. **Kapitel 6.1.3**).

5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, verschiedene Pathogenitätsfaktoren von EHEC hinsichtlich ihrer Struktur und Wirkungsweise zu charakterisieren. Dabei galt es, zunächst Stx1, Stx2, EHEC-Hly, EspP, Cdt, SfpA und EibG mittels UV-MALDI-TOF Massenspektrometrie über eine Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse zu identifizieren und strukturell zu charakterisieren. Dazu sollten die im Institut für Hygiene der WWU Münster exprimierten und elektrophoretisch getrennten Proteine im Gel mit Proteasen verdaut werden. Anhand der entstehenden, charakteristischen Schnittfragmente sollte eine Ableitung der Aminosäuresequenzen erfolgen mit, im Gegensatz zur Elektrophorese, eindeutigen Strukturinformationen.

Das Hauptaugenmerk der Analyse sollte dabei auf den Hauptpathogenitätsfaktoren der EHEC, Stx1 und Stx2, liegen. Mittels umfassender Detailuntersuchungen über ihre Struktur und ihre Interaktionen mit GSL aus Endothelzellen sollten Informationen über das genaue GSL-Rezeptor-Repertoire der Zellen erhalten werden. Dazu sollten die exakten GSL-Zusammensetzungen aus zwei Endothelzelllinien, den mikrovaskulären HBMECs und den makrovaskulären EA.hy 926 Zellen, mit besonderem Fokus auf die Globoserie-GSL mit den beiden Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer, verglichen werden. Der GSL-Nachweis in den zu untersuchenden Endothelzellen sollte durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit intakten Zellen und durch Dünnschichtchromatographie mit aus den Zellen isolierten GSL erfolgen. Die Stx-Rezeptoren sollten anschließend mittels ESI-Q-TOF Massenspektrometrie über ihre exakte Masse und eine anschließende Fragmentationsanalyse mit genauen Strukturdaten über den Oligosaccharid- und Ceramidteil charakterisiert werden.

Weiterhin galt es fötales Kälberserum auf seine GSL-Bestandteile hin zu analysieren, um aufzuklären, ob im Serum Stx-Rezeptoren vorhanden sind. Da Kälberserum häufig als wachstumsförderndes Supplement den Kulturmedien zugesetzt wird und kultivierte Zellen GSL aus dem Medium aufnehmen können, sollte eine umfassende strukturelle Charakterisierung der GSL-Komposition vom Serum durchgeführt werden. Aufgrund der Tatsache, dass Stx-Rezeptoren von Kulturzellen aufgenommen werden, könnten bei anschließender Analyse falsch positive Ergebnisse auftauchen, die zu Fehlinterpretationen der Messergebnisse führen. In diesem Falle könnte nicht mehr

zwischen endogenen und exogenen GSL in den Zellen unterschieden werden. Über eine dünnschichtchromatographische Trennung in Kombination mit der Overlay-Assay-Technik zur spezifischen Färbung der GSL sollten auch hier im Speziellen die Stx-Rezeptoren Gb3Cer sowie Gb4Cer der Globoserie untersucht werden. Mittels ESI-Q-TOF Massenspektrometrie sollten anschließend die mit Stx interagierenden GSL mittels vollständiger Strukturaufklärung analysiert werden.

Lipoproteine im humanen Plasma werden als mögliche Transporter für Stx im menschlichen Körper diskutiert. Dabei müssen die Stx vom Darm über den Blutkreislauf zu den mikrovaskulären Endothelzellen in der Niere gelangen. Aus diesem Grund galt es, zunächst den Gehalt von Stx-Rezeptoren in humanem Plasma zu bestimmen. Der Schwerpunkt sollte dabei auf der Ermittlung der Verteilung der GSL in Lipoproteinfraktionen liegen, welche mittels Saccharidgradientenzentrifugation gewonnen wurden. Die Stx-Rezeptoren sollten mittels Dünnschichtchromatographie und Overlay-Assay in GSL-Isolaten aus humanem Plasma und in aus den Lipoproteinfraktionen „Chylomikronen, VLDL und IDL“, „LDL“ sowie „HDL“ aus humanem Plasma isolierten GSL nachgewiesen werden. Anschließend galt es auch hier, eine GSL-Feincharakterisierung über ESI-Q-TOF Massenspektrometrie vorzunehmen, um den Aufbau der Rezeptoren in Bezug auf den Kohlenhydrat- und Fettsäureanteil zu ermitteln. Zusätzlich zu den Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer sollten im humanen Plasma auch die Monohexosylceramide mittels Fragmentationsanalyse in der ESI-Q-TOF Massenspektrometrie analysiert werden, da bei ihnen über einen Einfluss auf die Stx-Toxizität diskutiert wird und sie die Haupt-GSL im humanen Plasma sind.

6 Materialien und Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die Testverfahren und Versuchsbedingungen zur Toxin- und GSL-Rezeptor-Analytik beschrieben. Zudem werden die zur Anwendung nötigen Chemikalien und Lösungen aufgelistet.

6.1 Endothelzellen, fötales Kälberserum und humanes Plasma

Verschiedene Zellen und zwei Serumtypen wurden auf die GSL-Zusammensetzung und ihre Interaktion mit Stx untersucht, zwei Endothelzelllinien, sowie GSL-Isolate aus fötalem Kälberserum und humanem Plasma. Diese wurden mit immunchemischen und massenspektrometrischen Analyseverfahren bezüglich ihres GSL-Gehalts sowie ihres Shiga Toxin-Bindungsverhalten analysiert. Die bearbeiteten Zellen und Seren werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

6.1.1 Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden in T-Flaschen (Nunc) angezüchtet und danach im 1L-Superspinner nach Heidemann und Lehmann (Heidemann et al. 1994) kultiviert (vgl. **Abbildung 13**). Besonderheit dieses Bioreaktors ist der Membranrührer, welcher zum einen für eine Durchmischung im Spinner sorgt, zum anderen auch die Sauerstoffversorgung gewährleistet. Außerdem wird durch die ständige Taumbewegung des Rührers ein Anwachsen von Zellen an der Membran verhindert. Für die Kultivierung von adhärent wachsenden Endothelzellen im Superspinner wurde ein Microcarrier-System verwendet, welches durch Verwendung von kleinen Dextrankügelchen (Cytodex 3TM, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden), auf denen sich die Zellen anheften können, eine große Oberfläche innerhalb des Bioreaktors schafft.

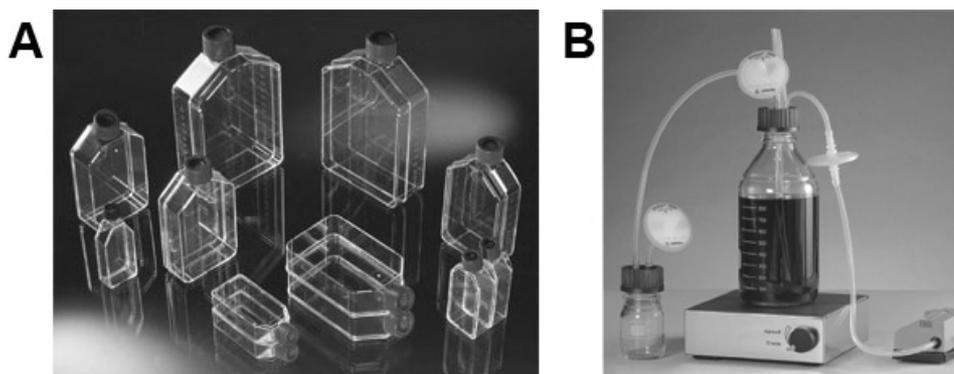


Abbildung 13: Kultivierungssysteme für Endothelzelllinien. (A) Handelsübliche T-Flaschen zum Kultivieren von adhärenz wachsenden Endothelzellen. Diese haften auf der Oberfläche der Polystyrolflaschen und werden über einen Membraneinsatz im Schraubdeckelverschluss begast. (Bildquelle: <http://www.nunc.de/>). (B) 1L-Bioreaktor-System konstruiert nach Heidemann und Lehmann (1994) Die Zellen wachsen auf Microcarriern, die über den Taumelrührer in Bewegung und damit in einer Suspensionskultur ähnlichen Zustand gehalten werden können. Die Gasversorgung findet über eine um den Rührer gewickelte, gasdurchlässige Membran statt (Quelle: <http://www.bioresearchonline.com/>).

6.1.1.1 Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMECs)

Als Modellzelllinie für mikrovaskuläre Endothelzellen wurden die von K. S. Kim beschriebenen HBMECs verwendet (Stins et al. 1997). Diese wurden mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Martina Bielaszewska aus dem Institut für Hygiene (WWU Münster) zur Verfügung gestellt. Sie wurden in der Passage 25 bei 37°C und 5% CO₂ in T-Flaschen inokuliert und kultiviert (Kulturmedium vgl. **Tabelle 2**), bei der Passage 30 in die Superspinnerkultur überführt, kultiviert, anschließend geerntet und umgehend in MeOH aufgenommen und bei -20°C gelagert. Für die Extraktion der GSL wurde das MeOH abfiltriert und die Lipide aus den Zellen sukzessive mit C/M 1/2, 1/1 und 2/1 (je v/v) behandelt. Die vereinigten GSL-Extrakte wurden anschließend mit 1M NaOH bei 37°C alkalisch hydrolysiert, um den Lipid-Rohextrakt von störenden Phospholipiden durch Verseifung zu befreien. Nach einem Dialyseschritt wurden die GSL-Extrakte im N₂-Strom eingengt und entsprechend einer Zellzahl von 1 x 10⁴ Zellen/μl in C/M 2/1 wiederaufgenommen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums für HBMECs

Kulturmedienbestandteil	Hersteller
RPMI 1640 Medium	Cambrex Biosciences, Verviers, Belgien
10% (v/v) FCS	Cambrex Biosciences
10% (v/v) Nu-Serum	Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA
2 mM l-Glutamin	Cambrex Biosciences
1 mM Na-Pyruvat	Cambrex Biosciences
1% (w/v) MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Cambrex Biosciences
1% (w/v) MEM Vitamine	Cambrex Biosciences
100 Einheiten/mL Penicillin und Streptomycin	Cambrex Biosciences

6.1.1.2 EA.hy 926 Zellen

Als makrovaskuläre Endothelzelllinie wurden die EA.hy 926 Zellen (Edgell et al. 1983) von Frau PD Dr. Martina Bielaszewska im Institut für Hygiene (WWU Münster) etabliert und für die Analytik in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei ihnen handelt es sich um eine Fusion aus *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) und der Lungenkarzinomzelllinie A549. Sie wurden bei Passage 8 bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur genommen (vgl. Tabelle 3 für das Kulturmedium), bei der Passage 13 in den Superspinner überführt, kultiviert, anschließend abgeerntet und in MeOH aufgenommen und bei -20°C gelagert. Für die GSL Extraktion wurde das MeOH abfiltriert und die Lipide aus den Zellen sukzessive mit C/M 1/2, 1/1 und 2/1 eluiert. Die Elution fungierte als Lösungsmittelextraktion der GSL, welche anschließend mit 1N NaOH bei 37°C alkalisch hydrolysiert wurden, um den Lipid-Rohextrakt von störenden Phospholipiden durch Verseifung zu befreien. Nach Dialyse wurden die GSL-Extrakte unter N₂-Begasung eingedampft und entsprechend einer Zellzahl von 1 x 10⁴ Zellen/μl in C/M 2/1 wiederaufgenommen.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kulturmediums für EA.hy 926 Zellen

Kulturmedienbestandteil	Hersteller
D-MEM:F-12 (1:1) + GlutaMAX-I Medium	Gibco Invitrogen, Paisley, Großbritannien
10% FCS	Cambrex Biosciences
100 Einheiten/mL Penicillin und Streptomycin	Cambrex Biosciences

6.1.2 Fötale Kälberserum (FCS)

Da fötales Kälberserum häufig in Kulturmedien verwendet wird (vgl. **Tabelle 2**), wurde seine GSL-Zusammensetzung im Detail analysiert. Die Aufarbeitungen der Serumproben wurden von Prof. Dr. Johannes Müthing durchgeführt. Bereits extrahierte und mittels Dialyse und alkalischer Hydrolyse aufgearbeitete GSL-Extrakte wurden über Ionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Sepharose und Normalphasenchromatographie mittels Kieselgel 60 aufgereinigt und mit der Kodierung JM10/23 für die weitere Arbeit verwendet.

6.1.3 Humanes Plasma

Da GSL in humanem Plasma möglicherweise am Stx-Transport innerhalb des menschlichen Körpers beteiligt sind, wurde dieses auf die GSL-Zusammensetzung analysiert. Die Aufarbeitungen von einem Großansatz der Plasmaproben wurden von Prof. Dr. Johannes Müthing durchgeführt. Bereits extrahierte und mittels Dialyse und alkalischer Hydrolyse gereinigte GSL-Extrakte wurden mit der Kodierung JM09/249 für die weitere Arbeit verwendet.

6.1.3.1 Lipoproteinfraktionen aus humanem Plasma

Ein Teil des humanen Plasmas aus demselben Großansatz wurde von Prof. Dr. Jerzy Roche Nofer (Zentrallabor der Universitätsklinik Münster) mittels Ultrazentrifugation in Lipoproteinfraktionen aufgetrennt, um zu überprüfen, mit welchen Lipoproteinen die Serum-GSL assoziiert sind. Die erhaltenen Fraktionen der *high-density*-Lipoproteine (HDL), der *low-density*-Lipoproteine (LDL), sowie die der *intermediate-density*- (IDL), *very-low-density*-Lipoproteine (VLDL) und Chylomikronen (Chy) wurden jeweils noch einmal mittels alkalischer Hydrolyse verseift, dialysiert, eingengt und in C/M/W (30/60/8, v/v/v) wiederaufgenommen. Nach Transfer in ein konisches Schraubdeckelröhrchen wurde das Ausgangsmaterial erneut mit (30/60/8, v/v/v) behandelt und im Ultraschallbad nachextrahiert. Die vereinigten Extraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend in definierten Volumina von C/M 2/1 wiederaufgenommen.

6.2 Antikörper

Für die immunologischen Testverfahren, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, kamen die nach **Tabelle 4** und **Tabelle 5** zusammengestellten AKs zum Einsatz:

Tabelle 4: Eingesetzte Primär-Antikörper.

Name	Epitop	Spezies	Isotyp	Klonalität	Klon	Referenz
Anti-Lc2Cer	Gal β 1-4Glc	Huhn	IgY	polyklonal	---	JM06/149-1
Anti-Gb3Cer	Gal α 1-4Gal	Huhn	IgY	polyklonal	---	JM06/298-1
Anti-Gb3Cer	Gal α 1-4Gal	Ratte	IgM	monoklonal	38.13	Beckman Coulter
Anti-Gb4Cer	GalNAc β 1-3Gal	Huhn	IgY	polyklonal	---	JM20/206
Anti-nLc4Cer	Gal β 1-4GlcNAc	Huhn	IgY	polyklonal	---	JM06/149-3
Anti-Stx1	Stx1	Maus	IgG1	monoklonal	109/4-E9b	Sifin, Berlin
Anti-Stx2	Stx2	Maus	IgG	monoklonal	135/6-B9	Sifin, Berlin

Tabelle 5: Eingesetzte Sekundär-Antikörper.

Name	Konjugat	Referenz
Kaninchen Anti-Huhn IgY (IgG)	Alkalische Phosphatase	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA</i>
Ziege Anti-Maus IgG + IgM	Alkalische Phosphatase	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA</i>
Ziege Anti-Ratte IgG + IgM	Alkalische Phosphatase	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA</i>
Kaninchen Anti-Huhn IgY (IgG)	DTAF	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA</i>
Ziege Anti-Maus IgG + IgM	DTAF	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; West Grove, PA, USA</i>

6.3 Immunfluoreszenz (IF)

Die Immunfluoreszenz (IF) ist ein Verfahren ähnlich dem *enzyme linked immunosorbent assay*, kurz ELISA, und diente in dieser Arbeit dem direkten Nachweis von Stx-Rezeptoren auf Endothelzellen. Die IF basiert auf einer Abfolge mehrerer immunreaktiver Bindungen, die schließlich über einen AK-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden. Für einen Bindungsnachweis werden die Zellen fixiert und ein auf den Zellen exprimiertes Antigen mit einem AK oder, wie im Beispiel von **Abbildung 14** dargestellt, einem Toxin und einem zusätzlichen anti-Toxin-AK inkubiert. Nach mehrfachen Waschschritten zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wird mit einem zweiten, Fluorochrom-gekoppelten Antikörper inkubiert, der schließlich fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Dabei wird der Farbstoff, in diesem Fall Dichlorotriazinylamino Fluoreszein (DTAF), mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, woraufhin Licht einer längeren Wellenlänge emittiert wird. Dieses Verfahren wird zum indirekten Nachweis für eine Bindung an ein Antigen eingesetzt.

Bei der IF von Zellen verwendet man zur Zellkernfärbung zusätzlich den DNA-Farbstoff 4'-6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid (DAPI). Dieses ermöglicht eine Beurteilung der Homogenität der Fluoreszenzfärbung, da DAPI jede Zelle anfärbt und somit direkt verglichen werden kann, ob diese auch alle mittels DTAF gefärbt sind.

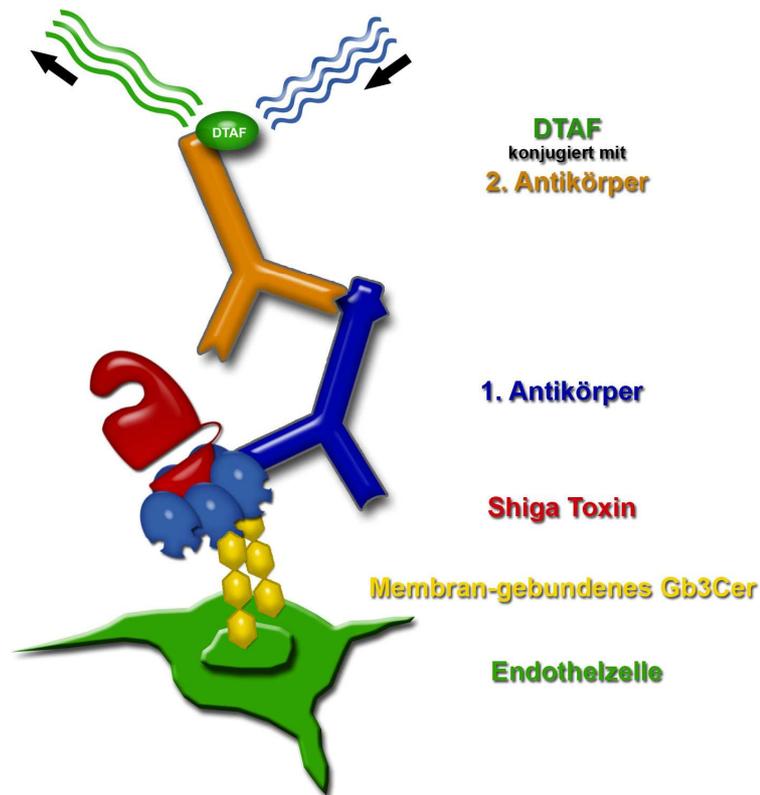


Abbildung 14: Prinzip der Immunfluoreszenz. Dargestellt ist eine Endothelzelle, an deren Oberfläche der Shiga Toxin Rezeptor Gb3Cer präsentiert wird. Bindet das Stx an den Rezeptor, kann über einen spezifischen Anti-Stx-AK (hier: 1. Antikörper) und einen mit DTAF konjugierten Sekundär-AK (hier: 2. Antikörper) ein indirekter Nachweis über die Anregung bei 495 nm und die Messung der Emission bei 528 nm erfolgen. DAPI wurde bei 368 nm angeregt und die Emission bei 488 nm gemessen.

Tabelle 6: Zusammensetzung des PBS-Puffers

PBS (engl: *phosphate buffered saline*)

8,00 g/L NaCl

0,20 g/L KCl

1,44 g/L Na₂HPO₄

0,20 g/L KH₂PO₄

Durchführung

Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden in 4-Kammer-Polystyrol Deckgläsern (*4-well chamber slides* Permanox, Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich) mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ pro Kammer (HBMECs) und 2×10^4 Zellen pro Kammer (EA.hy 926 Zellen) eingesät und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach

Fixierung mit 7% (w/v) Paraformaldehyd (Fischer, Saarbrücken) erfolgte zum Absättigen für 30 min eine Inkubation mit Blockierlösung (3% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA, Merck KGaA, Darmstadt) in PBS + 0,02% NaN₃). Anschließend wurden die Präparate dreimal mit Waschlösung (PBS + 0,02% NaN₃) behandelt und mit je 50 µl der primären anti-GSL-AK-Lösung (1:40 in 1% (w/v) BSA in PBS + 0,02% NaN₃), bzw. der Stx1-Lösung (0,2 µg/ml in 1% (w/v) BSA) für je eine Stunde inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Zugabe von je 50 µl Sekundär-AK-Lösung. Für den Stx1-Test folgten an dieser Stelle zunächst der Anti-Stx1-AK und erst darauf, wiederum nach dreimaligem Waschen, die Sekundär-AK-Lösungen. Als letzte Schritte wurden die DAPI-Färbung (je 50 µl DAPI-Färbelösung: 1 µg/mL DAPI (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) in PBS) und die Einbettung (ca. 1-2 Tropfen 20% (w/v) Mowiol, Calbiochem, Darmstadt) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden verschiedene Inkubationsschritte von parallel behandelten Zellpräparaten ausgelassen und vermessen.

Die Proben wurden im Institut für Infektiologie der WWU Münster unter der Leitung von Prof. Dr. M. Alexander Schmidt mit einem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Göttingen) bei einer Originalvergrößerung von x400 gemessen. Das Objektiv bestand aus einer Objektivlinse PlanNEOFLUAR (Zeiss) mit einer numerischen Apertur von 0,75. Die Fluoreszenzdaten wurden mit der AxioCam CCD (Zeiss) aufgenommen, mit dem Programm AxioVision 3.1 (Zeiss, 1300 x 1300 Pixel) dokumentiert und schließlich mit dem Programm Photoshop CS2 v9.0 (Adobe) bearbeitet.

6.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR, engl: *reverse transkriptase-polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation von Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl: *deoxyribonucleic acid*). Es kann dabei zur reinen Vervielfältigung oder zum Nachweis von geringen Mengen an DNA genutzt werden. In dieser Arbeit wurde die PCR genutzt, um die Expression von Glykosyltransferasen über den Nachweis von *messenger* RNA (mRNA) in Endothelzellen zu ermitteln. Die PCR basiert auf vielfachen Zyklen aus Erhitzen, Abkühlen und Temperaturhalten. Dabei denaturieren die DNA-Doppelstränge in der initialen Aufheizphase und trennen sich in Einzelstränge auf. Die Temperatur wird wieder abgekühlt, so dass sich spezifische Primer (kurze einzelsträngige Nukleotidketten) an die Einzelstränge anlagern können (*annealing*). Diese werden in der wiederum etwas erhöhten Temperatur-Haltephase über eine Polymerase zu Doppelsträngen vervollständigt. Durch ein Aufeinanderfolgen von vielen dieser Zyklen können so von einem Ausgangsmolekül große Mengen an DNA synthetisiert werden. Die einzustellenden Temperaturen sind dabei von den gewählten Primern abhängig und variieren in den einzelnen Experimenten (vgl. **Tabelle 7**).

Durchführung

Um die Expression der Glykosyltransferasen in den beiden Endothelzelllinien HBMEC und EA.hy 926 zu vergleichen, muss zunächst die Gesamtzell-RNA aus den Zellen isoliert werden. Dazu wurde von jeweils 1×10^6 Zellen mit dem RNeasy mini kit (Quiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll die Gesamt-RNA isoliert und diese anschließend mittels der *moloney murine leukemia virus* (M-MLV) reversen Transkriptase (RT) in sogenannte *copyDNA* (cDNA) transkribiert. Dazu wurde das SuperSkript™ II RT Kit von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die einmal so in cDNA übersetzte RNA kann nun mittels spezifischer Primer durch die PCR auf die Expression von verschiedenen Produkten getestet werden.

Für diese Arbeit wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 7: Primer für die PCR von Glycosyltransferasen.

Zielstruktur	Primersequenz	Annealingtemperatur	Amplifikat
Lc2er-Synthetase	5'-AACGGTACAGATTATCCCGAAGG-3' 5'-TGGAGCTAACTCTGGCATGAGG-3'	62°C	912 bp ¹
Gb3Cer-Synthetase	5'-ATGTCCAAGCCCCCGACCTC-3' 5'-GAGCTGCCCTTCTCCTTGGG-3'	64°C	175 bp
Gb4Cer-Synthetase	5'-ATGGCCTCGGCTCTCTGGACT-3' 5'-TTGTAGTGGGGAAGGCTGAGGT-3'	64°C	125 bp

¹Basenpaare

Der Zyklus für die PCR bestand aus folgenden Schritten: einer initialen Aufheizphase zum Aufbrechen der Doppelstränge von 3 min 30 s bei 94°C, darauffolgend je 30 Zyklen aus einem 15 s Aufheisschritt bei 94°C sowie einem 30 s Annealingschritt bei den in **Tabelle 7** aufgelisteten Temperaturen, gefolgt von einem Elongationsschritt für die Polymerase für 1 min bei 72°C. Nach 30 Zyklen erfolgte eine Endelongation für 10 min bei 72°C sowie ein Abkühlen auf 4°C, um die entstandenen Amplifikate über einen längeren Zeitraum stabil zu halten. Die amplifizierte DNA-Stränge wurden abschließend in einem 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid detektiert. Die gefärbte DNA wurde mittels UV-Licht unter einem Transilluminator mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht.

6.5 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein Trennverfahren, das Analytsubstanzen nach ihrer Polarität auftrennt. Es wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um GSL-Extrakte aus Endothelzellen, FCS und humanem Plasma aufzureinigen und zu trennen, um anschließend eine Detektion der Einzelsubstanzen zu ermöglichen. Die DC basiert auf einer stationären (hier: Kieselgel 60 immobilisiert auf *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC)-Fertigplatten, 10 cm x 10 cm, 0,2 cm Schichtdicke, Merck KGaA, Darmstadt) und einer mobilen Phase (verschiedene Zusammensetzungen, vgl. **Tabelle 8**). Speziell für die Chromatographie von Lipiden und GSL gibt es verschiedene Laufmittel, die für die verschiedenen Substanzklassen optimiert sind. Die DC für GSL wurde zum ersten Mal detailliert von Vladimir P. Skipski im Jahr 1975 beschrieben (Skipski 1975, Müthing 1996).

In der nachfolgenden Tabelle sind die für die DC benötigten Laufmittel aufgelistet und beschrieben.

Tabelle 8: Laufmittelzusammensetzung zur Trennung von GSL

Laufmittel 1 für nGSL

C/M/W 120/70/17 (v/v/v) + 20 mg CaCl ₂ /100 mL

Laufmittel 2 für Ganglioside

C/M/W 120/85/20 (v/v/v) + 20 mg CaCl ₂ /100 mL

Die Analytlösungen wurden halbautomatisch mit einem Linomat IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz) auf die Kieselgelplatte aufgetragen und in einen Glaskolk mit Laufmittel überführt, dort 20 min chromatographiert und anschließend mit verschiedenen Färbetechniken untersucht (vgl. **Kapitel 6.5.2 bis 6.5.4**).

6.5.1 Trennung von Monohexosylceramiden per DC

Monohexosylceramide (mit unterschiedlichen Saccharidanteilen) lassen sich dünn-schichtchromatographisch mit den aufgelisteten Laufmitteln nicht voneinander trennen. Um z. B. GalCer und GlcCer im Chromatogramm unterscheiden zu können, müssen die Monohexosylceramide zunächst vorbehandelt werden. Über die Bildung von Boratkomplexen können GalCer und GlcCer mittels DC aufgetrennt werden.

Dazu wurden die Proben mit dem Applikator auf die DC-Platte aufgetragen und anschließend mit einer 1,5%igen (w/v) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -Lösung in H_2O besprüht. Danach erfolgte eine intensive Trocknung bei 37°C für 30 min im Trockenschrank und über Ölpumpenvakuum im Exsikkator mit P_2O_5 als Trocknungsmittel für 30 min. Anschließend wurde die chromatographische Trennung mit C/M/W/25% Ammoniaklösung (65/25/4/0,5 v/v/v/v) für 25 min in einem geschlossenen Glastank durchgeführt. Nach kurzer Trocknungsphase bei RT für 5 min erfolgte unmittelbar die Gesamtzuckerfärbung mit Orcin (vgl. **Kapitel 6.5.3**).

6.5.2 Overlay-Assay

Mittels Overlay-Assays wurden in der vorliegenden Arbeit die per DC getrennten GSL spezifisch angefärbt. Auch der Overlay-Assay ist ein Antikörper-basiertes Verfahren ähnlich dem ELISA. Verschiedene Immunglobuline, Toxine oder auch Lektine werden zur Bindung der Analytmoleküle eingesetzt, um schließlich mit einem AK-gekoppelten Enzym indirekt das ursprüngliche Antigen nachzuweisen (vgl. **Abbildung 15**).

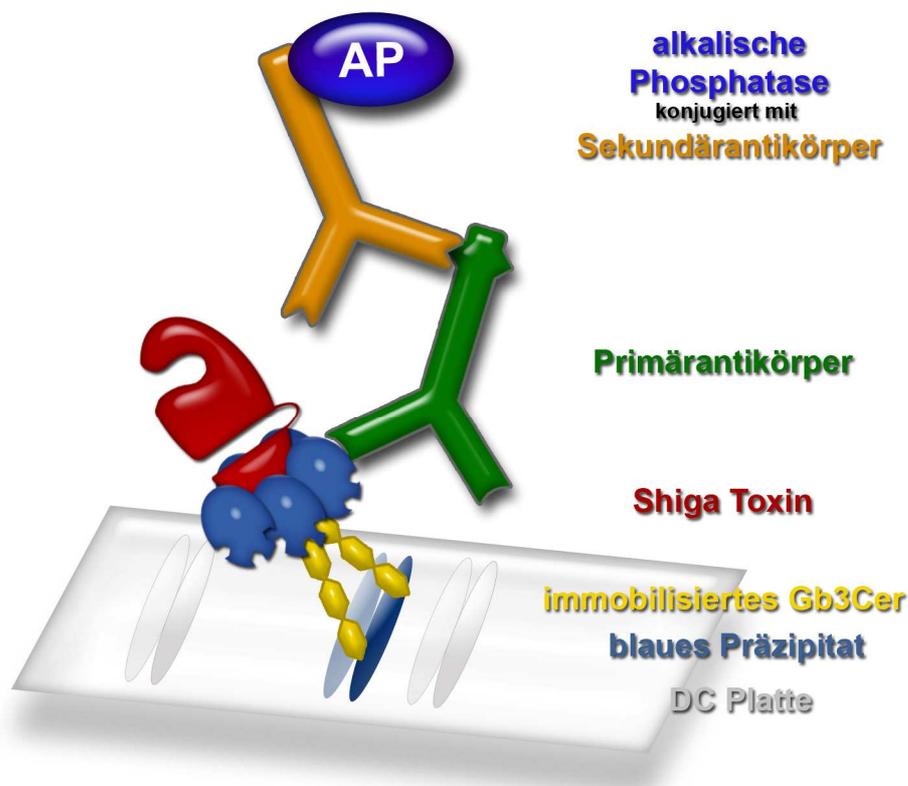


Abbildung 15: Prinzip eines Overlay-Assays mit Stx. Stx bindet an dünn-schichtchromatographisch getrennte GSL-Rezeptoren. Durch spezifische Primär-AK und Enzym-gekoppelte Sekundär-AK erfolgt der visuelle Nachweis der Bindung. Hierfür wird ein präzipitierender Farbstoff verwendet, welcher durch das Sekundär-AK konjugierte Enzym (hier: Alkalische Phosphatase; AP) umgesetzt wird und am Ort der Stx-Bindung ausfällt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Glycinpuffers für Overlay-Assays

Glycinpuffer (pH 10,4)

0,1 M Glycin

1 mM ZnCl₂

1 mM MgCl₂

Durchführung

Die DC-Platten mit den chromatographisch getrennten GSL wurden im Exsikkator über ein Ölpumpenvakuum getrocknet und direkt im Anschluß wurde das Kieselgel mit den GSL mit 0,5% (w/v) Plexigum (Polyisobutylmethacrylat, P28; Röhm, Darmstadt) in n-Hexan fixiert. Dazu wurden die DC-Platten für 50 min in einen geschlossenen Glastank mit wenigen mL Plexigumlösung gestellt. Nach einer Inkubation mit CMF-PBS bei 37°C über Nacht erfolgte das Absättigen mit Lösung A (1% BSA (w/v) (Merck KGaA, Darmstadt) in CMF-PBS + 0,02% NaN₃) für mindestens 15 min. Die geblockten DC-Platten wurden anschließend mit den Primär-AK-Lösungen (1:2000 in Lösung A) oder wie in **Abbildung 15** dargestellt mit Stx (0,2 µg/ml Lösung A) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Lösung B (0,05% (w/v) Tween 21 (ICI, Surfactans, Wilton; UK) in CMF-PBS + 0,02% (w/v) NaN₃), um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde ein zweiter, Enzym-gekoppelter AK (1:2000 in Lösung A) hinzugegeben. Im Falle der Stx1- und Stx2-Tests wurden an dieser Stelle zunächst noch einmal gegen Stx1 und Stx2 direkt gerichtete AK und erst darauf folgend ein Enzym-gekoppelter AK eingesetzt. Der entstandene Komplex kann anschließend durch den Einsatz eines Chromogens, das von dem Enzym in ein gefärbtes Präzipitat umgewandelt wird, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden für den Bindungsnachweis AP-konjugierte AK verwendet, wobei die AP 0,05% (w/v in Glycin-Puffer) 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat (BCIP, Roth, Karlsruhe) in ein blaues Präzipitat umwandelt. Dieses Verfahren kann als indirekter Nachweis für eine Bindung am Antigen dienen.

6.5.3 Gesamtzuckerfärbung

Zum Nachweis von Kohlenhydratverbindungen nach dünnschichtchromatographischer Trennung werden die DC-Platten 10 s in eine 0,3%ige (w/v) Orcin-Lösung (in 3 M H₂SO₄) getaucht. Unter Hitzeeinwirkung durch Aufheizen der DC-Platte auf 100°C mittels einer Heizplatte (CAMAG, Muttenz, Schweiz) werden die Kohlenhydratverbindungen gespalten, und es bildet sich ein 5-Hydroxymethylfurfural (Almog und Shirey 1978), welches stöchiometrisch mit zwei Orcinmolekülen zu einem farbigen Produkt reagiert (vgl. **Abbildung 16**). Diese Färbung kann densitometrisch mit dem Scanner CD60 (Desaga, Heidelberg) bei 544 nm dokumentiert werden.

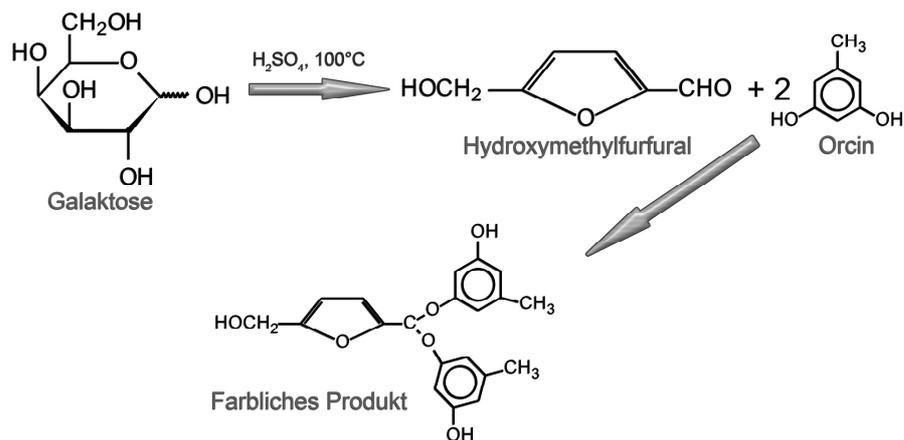


Abbildung 16: Prinzip der Orcinfärbung. Durch Hitzeeinwirkung ($100^\circ C$) und Schwefelsäure (H_2SO_4) entsteht aus Hexosen ein 5-Hydroxymethylfurfural, welches mit zwei Orcinmolekülen zu einem dunkelviolett bis braunen Produkt reagiert.

6.5.4 Lipidfärbung

Zur Detektion von Lipiden auf der DC-Platte wird der anionische, lipophile Thiazolfarbstoff Primulin verwendet (Skipski 1975, White et al. 1998, vgl. **Abbildung 17**). In Lösung weist er unter sichtbarem Licht eine schwach gelbe Färbung auf, zeigt jedoch unter UV-Licht eine Emission im blauen Spektralbereich (Pick 1935). Das Absorptionsmaximum bzw. ein lokales Maximum von Primulin liegt bei 356 nm (The Sigma Aldrich handbook of stains and dyes 1990), so dass eine Detektion der gefärbten Banden bei Einstrahlung von 366 nm UV-Licht mit einer handelsüblichen EPI-UV Leuchtröhre erfolgt. Zur Färbung werden die DC-Platten nach erfolgter Chromatographie für 10 sek in $0,02\%$ Primulin in Aceton/Wasser ($4/1$, v/v) getaucht, an der Luft getrocknet und anschließend dokumentiert.

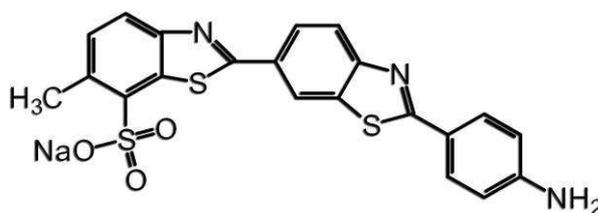


Abbildung 17: Lipophiler Thiazolfarbstoff Primulin. Dargestellt ist die chemische Struktur des Farbstoffes, der für die Lipidfärbung eingesetzt wird.

6.5.5 Dokumentation

Zur Dokumentation der Ergebnisse der immunchemischen Tests wurden zwei Systeme verwendet. Zur quantitativen Analyse von DC-Daten wurde der Scanner CD60 (Desaga, Heidelberg) verwendet und zur Aufnahme der Gele sowie DC-Platten in Bilddateien der Photo-Imager E-Box 3000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Immunfloreszenzdaten wurden mit einem Axiophot Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und bearbeitet. Die Bilddateien wurden abschließend mit der Bildverarbeitungssoftware Photoshop CS2 v9.0 (Adobe) bearbeitet.

6.5.6 Extraktion von GSL aus Kieselgelplatten

Um die immunchemisch gefärbten GSL-Banden anschließend massenspektrometrisch analysieren zu können, wurden sie mit einem Skalpell abgekratzt und in eine mit Whatman-Papier (Whatman GmbH, Dassel) als Fritte bestückte Glaskapillare transferiert. Die GSL wurden dann mehrfach mit C/M/W 30/60/8 (v/v/v) aus dem Kieselgel eluiert, eingengt und in C/M 2/1 in definierten Volumina wieder aufgenommen.

6.6 Massenspektrometrische Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Massenspektrometer (MS) verwendet: ein Q-TOF MS (Micromass, Milford, Massachusetts, USA) mit nanoESI-Quelle, ein axial-TOF MS (Reflex III, Bruker Daltonics, Bremen) mit UV-MALDI-Quelle und ein orthogonal-TOF MS (MDS Sciex, Concord, ON, Canada) (Aufbau siehe Loboda et al. 2003) ebenfalls mit UV-MALDI-Quelle. Ersteres ermöglicht kontinuierliche Messungen über längere Zeiträume hinweg. Bei dieser Art der Ionisierung treten häufig mehrfach geladene Moleküle auf (vgl. **Kapitel 6.6.1**). Die beiden UV-MALDI Geräte arbeiten mit durch Matrices kristallisierten Proben, was eine gänzlich andere Probenpräparation erfordert (vgl. **Kapitel 6.6.2**). Bei der UV-MALDI-TOF MS treten fast ausschließlich einfach geladene Moleküle auf und die Geräte haben gegenüber dem Q-TOF MS eine höhere Sensitivität. Gerade durch die Kombination der drei Geräte können umfangreiche Informationen über die analysierten Proben generiert werden. Die genauen Unterschiede der Ionisierungsprozesse sowie der Analysatoren werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

6.6.1 Elektrospray Ionisations Quadrupol Massenspektrometrie (ESI-Q-TOF MS)

Die Elektrospray Ionisation (ESI) zählt ebenso wie die Matrix-unterstützte Laser/Desorptions Ionisation (MALDI) zu den sanften und schonenden Ionisierungsarten und ist dadurch besonders für die Analytik von Biomolekülen geeignet. Bei der ESI wird ein Lösungsmittel-Analyt-Gemisch über eine Glaskapillare in ein elektrisches Feld gesprüht. Wie an dem in dieser Arbeit verwendeten Q-TOF MS kann durch geschicktes Anlegen von elektrischen Feldern ein Z-förmiges Spray geformt werden, durch das geladene Analytmoleküle Richtung Analysator gelangen. Neutralteilchen werden nicht in Richtung des Z-Sprays abgelenkt und gelangen so nicht in den Analysator. In den versprühten Lösungsmittel-Analyttröpfchen verdampft kontinuierlich das Lösungsmittel, so dass sich das Tröpfchen verkleinert und sich seine Ladungsdichte sukzessive erhöht. Übersteigen die Abstoßungskräfte der Ladungen die Oberflächenspannung, so kommt es zu einem explosionsartigen Zerfall des Tröpfchens. Der Punkt, an dem dieses geschieht, wird als Raleigh-Limit bezeichnet, und man spricht von einer sogenannten Coulomb-Explosion. Schrittweises Lösungsmitelverdampfen und weitere Tröpfchenspaltungen führen letztendlich zum vollständigen Verlust an Neutralteilchen, sodass ausschließlich geladene Analytmoleküle in die Gasphase gelangen und den Analysatoren zugeführt werden.

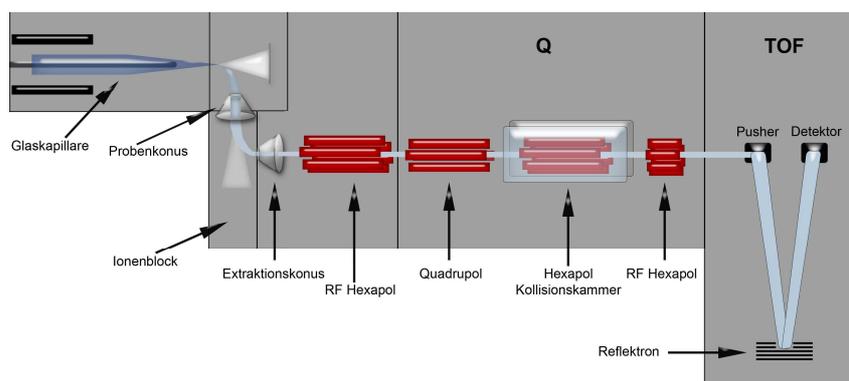


Abbildung 18: Schema eines Q-TOF Massenspektrometers. Eine Analytlösung wird über eine Glaskapillare ins Massenspektrometer gesprüht. Neutralteilchen werden durch den Aufbau des Z-Sprays aus der Probe entfernt. Über einen fokussierenden Hexapol gelangen die Analytmoleküle in den ersten Analysator, den Quadrupol (Q) und schließlich in den zweiten Analysator, das Flugrohr (TOF, engl: *time of flight*). Über eine zwischengeschaltete Hexapolkollisionskammer können neben MS1- auch Tandem-MS-Experimente durchgeführt werden, in denen selektionierte Molekülionen fragmentiert und analysiert werden.

Als Analysatoren werden ein Quadrupolmassenfilter und ein Flugzeit-Analysator verwendet (vgl. **Abbildung 18**). Der Quadrupol besteht aus vier parallel zueinander angeordneten stabförmigen Elektroden, die ein hochfrequentes, elektrisches Feld erzeugen. Die jeweils gegenüberliegenden Stäbe sind dabei gleichgeschaltet. Durch eine Anpassung der Frequenz und der Amplitude des Feldes ist es möglich, dass nur Molekülonen mit definiertem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) den Quadrupol auf einer stabilen oszillierenden Bahn passieren können. Ionen mit differierenden m/z -Werten kollidieren aufgrund instabiler Flugbahnen mit den Stabelektroden und gelangen nicht zum Detektor.

Der Flugzeitanalysator gehört zu den am häufigsten eingesetzten Analysatoren in der modernen Massenspektrometrie. Sein Separationsprinzip beruht auf der Trennung von geladenen Ionen in einer feldfreien Driftstrecke im Hochvakuum. Die in der Quelle erzeugten Ionen werden durch eine Extraktionsspannung beschleunigt und erhalten dadurch eine kinetische Energie E_{kin} .

Für ein Teilchen mit der Masse m , der Ladung Z und der Geschwindigkeit v gilt somit bei einer Extraktionsspannung U_e unter Berücksichtigung der Elementarladung e folgendes für E_{kin} :

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m \times v^2 = Z \times e \times U_e$$

Es ergibt sich somit für die Geschwindigkeit v :

$$v = \sqrt{\frac{2 \times E_{kin}}{m}} = \sqrt{\frac{2 \times Z \times e \times U_e}{m}}$$

Verwendet man nun für die Geschwindigkeit v ihre Definition als Weg d pro Zeit t ergibt sich folgendes für die Zeit t :

$$t = \frac{d}{v} = \frac{d}{\sqrt{2 \times e \times U_e}} \times \sqrt{m/z}$$

Die gemessene Zeit ist folglich abhängig vom Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z , so dass durch die im Massenspektrometer gemessene Flugdauer das exakte m/z -Verhältnis bestimmt werden kann.

Für eine exakte Strukturbestimmung von Biomolekülen besitzen moderne Massenspektrometer zusätzlich zu Quadrupol und Flugrohr noch Hexapol-Kollisionskammern. In diesen kann über eine Kollision mit inertem Stoßgas, wie z. B.

Argon, eine Fragmentierung von Ionen erzeugt werden. Selektioniert man nun über den Quadrupol Ionen eines definierten m/z -Wertes und fragmentiert diese anschließend in der Kollisionskammer, so kann im anschließenden Flugrohr eine exakte Bestimmung sämtlicher Molekülfragmente erfolgen und damit eine genaue Strukturanalyse ermöglicht werden.

6.6.1.1 Tandem-MS von GSL

Für die Fragmentierung von GSL, die zur exakten strukturellen Charakterisierung der GSL-Rezeptoren unerlässlich ist, gibt es eine von Domon und Costello im Jahr 1988 veröffentlichte Nomenklatur (Domon und Costello 1988a, 1988b). Sie führten eine Einteilung der bei GSL entstehenden Fragmente in bestimmte Serien ein. Die A-, B- und C-Serie beschreiben den Saccharidanteil, Fragmente der X-, Y- und Z-Serie beinhalten das Ceramid. B und C sowie Y und Z unterscheiden sich jeweils durch die Tatsache, dass eine der Serien einem Bruch vor und die Andere einem Bruch hinter der glykosidischen Bindung entspricht. Moleküle, die durch Spaltungen innerhalb eines Zuckers entstehen, werden der A- bzw. der X-Serie zugeordnet. Eine genaue Übersicht liefert **Abbildung 19**.

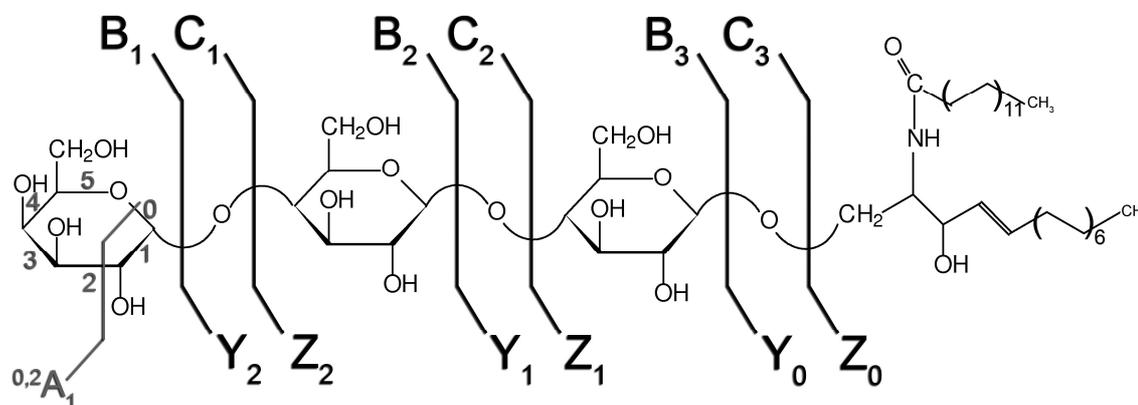


Abbildung 19: Fragmentierungsschema von Gb3Cer/CD77 nach Domon und Costello (1988). Dargestellt ist ein Gb3Cer-Molekül mit allen Fragmentationen der B-, C-, Y- und Z-Serie. Die Buchstaben geben an, ob das Fragment den Zucker- (A, B oder C) oder den Ceramidpart enthält (X, Y oder Z); die tiefgestellten arabischen Ziffern hingegen zeigen an, wieviele Zuckermoleküle das Fragment besitzt. Die durch Ringspaltungen entstehenden Serien (A und X) besitzen weitaus mehr Variabilität und sind nur durch einen exemplarischen Vertreter dargestellt. Hier geben zusätzlich zu den Buchstaben und tiefgestellten Ziffern noch die hochgestellten Ziffern an, an welcher Stelle der Bruch der glykosidischen Bindung stattgefunden hat. In dem hier gezeigten Beispiel erfolgt der Bruch zwischen den Bindungen 0 und 2 (in graau dargestellt).

Die Entdeckung von weiteren Fragmentierungsmechanismen machte eine Erweiterung dieser Nomenklatur jedoch unumgänglich, sodass Adams und Ann 1993 und schließlich Levery 2000 das Schema so erweiterten, wie es in dieser Arbeit verwendet wird. Ein Schema der häufigsten Fragmentationen wird in **Abbildung 20** gezeigt (Adams und Ann 1993, Levery et al. 2000).

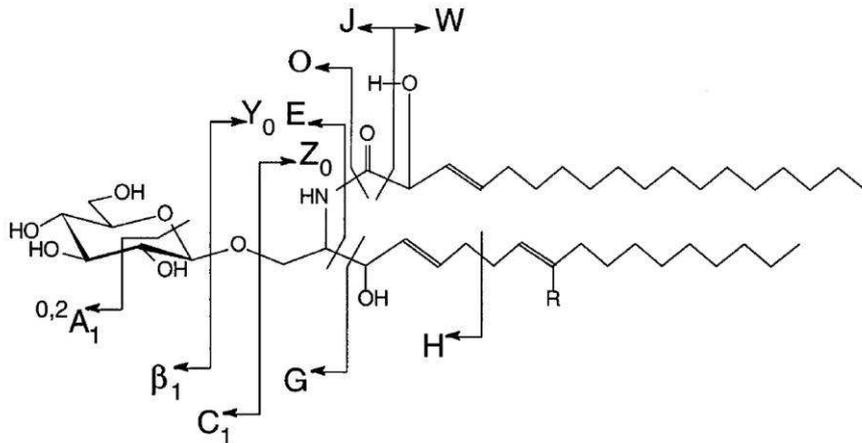


Abbildung 20: Fragmentierungsschema von GlcCer. Aufgeführt sind die von Levery 2000 modifizierten Bezeichnungen für die Fragmentierung von GSL.

6.6.2 Matrix-unterstützte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Bei der MALDI-TOF MS wird der zu detektierende Analyt mit einer meist organischen Matrix vermischt und auskristallisiert. Dabei wird die Matrix, häufig eine organische Säure wie z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, in einem 1000- bis 10000-fachen Überschuß mit der Probe gemischt und schließlich als Gemisch eingetrocknet (vgl. **Abbildung 21**).

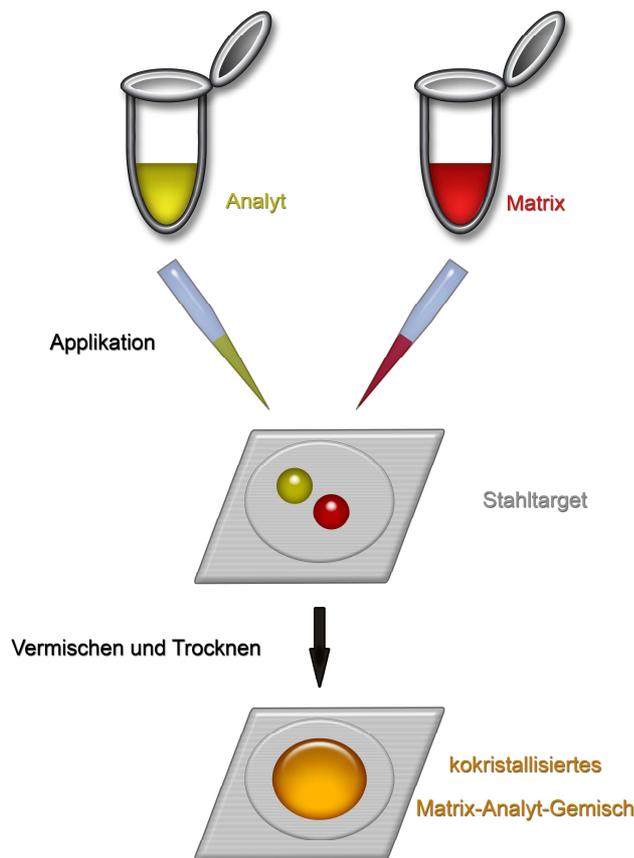


Abbildung 21: Präparation für die MALDI Massenspektrometrie. (modifiziert nach Lottspeich). Bei der Probenpräparation für die MALDI MS werden Matrix und Analyt in einem Verhältnis von etwa 1000 bis 10000 zu 1 auf ein Stahltarget appliziert, vermischt und kokristallisiert.

Die Matrix erfüllt dabei mehrere Zwecke. Zum einen verwendet man Matrizes, welche bei der Wellenlänge des eingestrahnten Lasers gut absorbieren und somit die eingetragene Energie aufnehmen. Zum anderen dient die Matrix als Protonendonator und unterstützt die Molekülionisierung. Die Energie des Lasers wird über resonante Energiekopplung auf die Matrix übertragen und sorgt für eine lokale Explosion im Matrix-Analyt-Gemisch, durch welche ein Teil des Gemisches desorbiert und in die Gasphase gebracht wird. In dieser Explosionswolke befinden sich neben Neutralteilchen auch geladene Matrix und Analytmoleküle, welche mittels nachgeschaltetem Analysator untersucht werden können. Ein Schema des Prozesses der Ionisierung ist in **Abbildung 22** dargestellt. Die Wahl der Matrix ist stark vom Analyten bzw. der zu detektierenden Spezies abhängig, da sowohl für unterschiedlich große Massen als auch für den Positiv- respektive Negativ-Ionenmodus unterschiedliche Matrixsubstanzen verwendet werden (Horneffer et al. 1999, Gobom et al. 2001, Schiller et al. 2007).

Als Desorptions-Laser wird in dieser Arbeit ein N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Impulsdauer von 3 ns verwendet. Als Matrix kam 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) zum Einsatz.

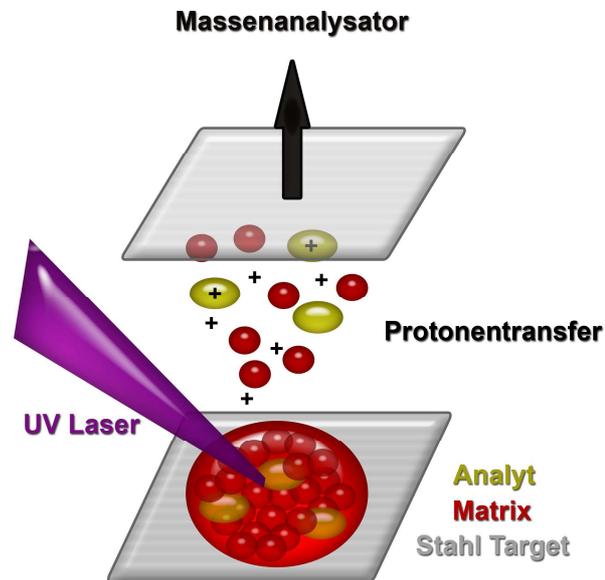


Abbildung 22: Ionisationsprozess bei der MALDI. Das kokristallisierte Matrix-Analyt-Gemisch wird mit einem UV-Laser beschossen; es bildet sich eine Desorptionswolke, und geladene Analytmoleküle gelangen nach einer Beschleunigung im elektrischen Feld in den Massenanalysator.

6.6.3 Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF)

Das Prinzip des Peptidmassen-Fingerabdruckes (PMF, engl: *peptide mass fingerprint*, vgl. **Abbildung 23**) basiert auf einem proteolytischen Verdau eines in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteins. Die entstehenden Peptidfragmente sind dabei mit wenigen Ausnahmen, z. B. bei äußerst homologen Proteinen, charakteristisch für die einzelnen Ausgangsproteine. Durch das entstehende Muster aus Verdaufragmenten kann so, einem Fingerabdruck gleich, das Protein zweifelsfrei identifiziert werden (siehe **Abbildung 23**) (Aebersoldt 2001, Shevchenko 1996).

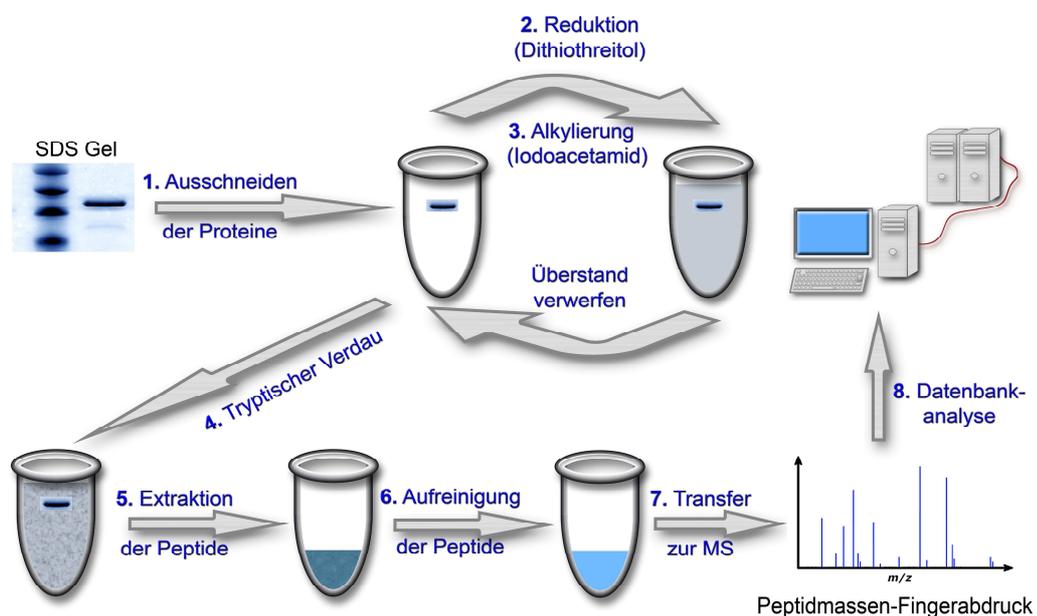


Abbildung 23: Schema eines In-Gel-Verdau und Erstellung eines anschließenden Peptidmassen-Fingerabdruckes (PMF engl.: *peptide mass fingerprint*). Die Proteinbanden werden zunächst aus dem Gel ausgeschnitten (1.), vorbereitend für den enzymatischen Verdau (4.) chemisch modifiziert (2., 3.) und anschließend extrahiert (5.) und aufgereinigt (6.). Nach massenspektrometrischer Analyse (7.) erfolgt die Auswertung und der Abgleich mittels verschiedener Datenbanken (8.).

Für den PMF wurden zunächst die zu analysierenden Proteine mit Hilfe eines Skalpell oder einer Rasierklinge aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Polypropylen-Reaktionsgefäß überführt (1.). Die Gelstücke wurden mit Acetonitril (ACN) entwässert und anschließend mit reduzierenden (2.) und alkylierenden Reagenzien (3.) inkubiert. Die Reduktion mit 10 mM Dithiothreitol in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (NH_4HCO_3) diente dabei dem Auftrennen der

Disulfid-Brücken, die Alkylierung mit 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 dem Unterbinden einer erneuten Ausbildung der Brücken. Nach Entwässerung erfolgte die enzymatische Reaktion, hier mit einer Proteaselösung von 0,025 μg Trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) / μL 50 mM NH_4HCO_3 bei 37°C über Nacht (4.). Ab diesem Reaktionsschritt befanden sich im Reaktionsgefäß kleine Peptide statt der intakten Proteine, so dass eine Entwässerung und Trocknung mit Acetonitril folglich bereits der Extraktion der Peptide entsprach (5.). Diese mussten zur Vorbereitung auf die Massenspektrometrie entsalzen werden, da Salze den Kristallisationsprozeß in der MALDI-TOF MS behindern. Die Entsalzung erfolgte mittels Umkehrphasenchromatographie (6., ZipTipC18, Millipore, Billerica, MA, USA), die den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt wurde. Die aufgereinigten Peptide konnten direkt für die Massenspektrometrie verwendet werden (7.). Die gemessenen m/z -Werte wurden zur Auswertung an verschiedene Datenbanken gesendet (8.), darunter ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy), sowie das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*).

7 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Strukturidentität der Virulenzfaktoren aus EHEC, Stx1, Stx2, EHEC-Hly, EspP, Cdt, SfpA und EibG mittels UV-MALDI-TOF MS zu überprüfen, sowie die Interaktionen zwischen Stx1 und Stx2 und ihren Rezeptoren in Endothelzellen, FCS und humanem Plasma mittels IF, DC Overlay-Assay und ESI-Q-TOF MS näher zu untersuchen. Dazu wurde zunächst von den gelelektrophoretisch getrennten Pathogenitätsfaktoren eine PMF-Analyse durchgeführt und die Ergebnisse mit Internetdatenbanken abgeglichen, da eine Verifizierung der Strukturidentität Grundvoraussetzung für weitere Bindungs- und Zytotoxizitätsstudien ist. Mit den Hauptpathogenitätsfaktoren der EHEC, Stx1 und Stx2, wurden zudem Interaktionsstudien mit HBMECs und EA.hy 926 Zellen mittels IF und schließlich mit GSL-Isolaten aus beiden Zelllinien, sowie aus FCS und aus humanem Plasma mittels DC und MS durchgeführt. In den folgenden Abschnitten der Dissertation werden die Ergebnisse dieser Experimente vorgestellt und beschrieben.

7.1 Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren aus EHEC mittels MALDI-TOF MS

Um eine detaillierte Rezeptorcharakterisierung von Biomolekülen (hier: Stx1 und Stx2) durchzuführen, muss zunächst die Strukturidentität der Ausgangssubstanzen überprüft werden. Dazu werden in den folgenden Abschnitten die Ergebnisse der MALDI-TOF MS-Untersuchungen mittels PMF zur Protein-Identifizierung der Pathogenitätsfaktoren Stx1, Stx2, EHEC-hly, EspP, Cdt, SfpA und EibG dargestellt. Wenn nicht anders beschrieben, fanden die Messungen im Positiv-Ionenmodus statt.

7.1.1 Stx

Die von Frau PD Dr. Martina Bielaszewska aufgereinigten Stx1 und Stx2 wurden gelelektrophoretisch getrennt und zur Überprüfung der Reinheit zur Verfügung gestellt. Im Gel von Stx1 und 2 zeigten sich jeweils zwei intensiv Coomassie Blau gefärbte Banden. Diese korrespondierten mit den Molekulargewichten der A- und B-Untereinheiten. Unterhalb der A-Untereinheiten wurden zusätzlich jeweils zwei schwach gefärbte Banden detektiert (vgl. **Abbildung 24**). Erkennbar war der deutliche

Größenunterschied zwischen Stx1 und Stx2. Sowohl die A- als auch die B-Untereinheiten des Stx2 zeigten im Gel höhere Molekulargewichte (ca. 33 kDa und 8 kDa) als die des Stx1 (ca. 32 kDa und 7 kDa), was auch den Sequenzinformationen aus den Datenbanken entspricht.

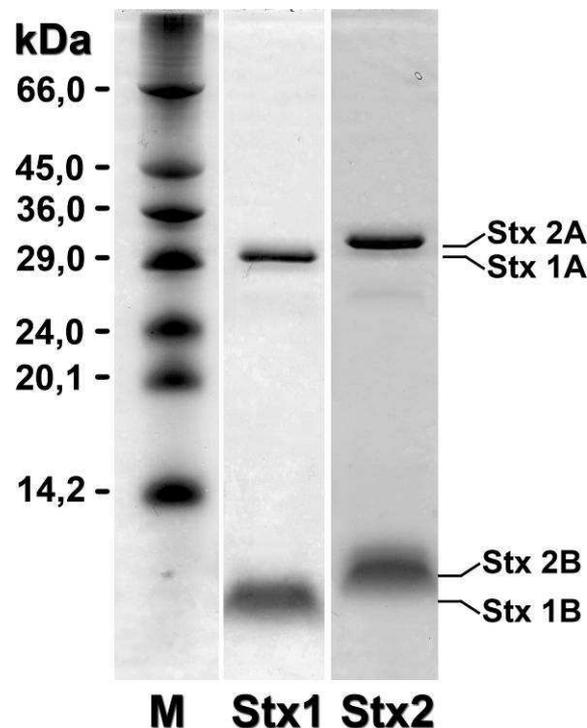


Abbildung 24: SDS-Gel von Stx1 und Stx2. Es wurden je 3 µg von Stx1 und Stx 2 in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Für die MALDI-TOF-Messungen wurden alle Coomassie Blau gefärbten Banden ausgeschnitten, die Proteine chemisch mit Dithiothreitol reduziert und mit Iodacetamid alkyliert. Anschließend erfolgte der tryptische Verdau der Proteine. Nach Extraktion und ZipTip^{C18}-Aufreinigung bzw. Entsalzung der Proben wurden diese mittels UV-MALDI-TOF MS vermessen. Dabei konnten die In-Gel-verdauten Proteine mittels PMF-Massenspektrometrie über die detektierten Peptidfragmente als Stx1 (A- und B-Untereinheit) und Stx2 (A- und B-Untereinheit) identifiziert werden. Die Spektren der Messung und die Zuordnung entsprechender Proteinsequenzen sind für Stx1 in **Abbildung 25** und für Stx2 in **Abbildung 26** dargestellt.

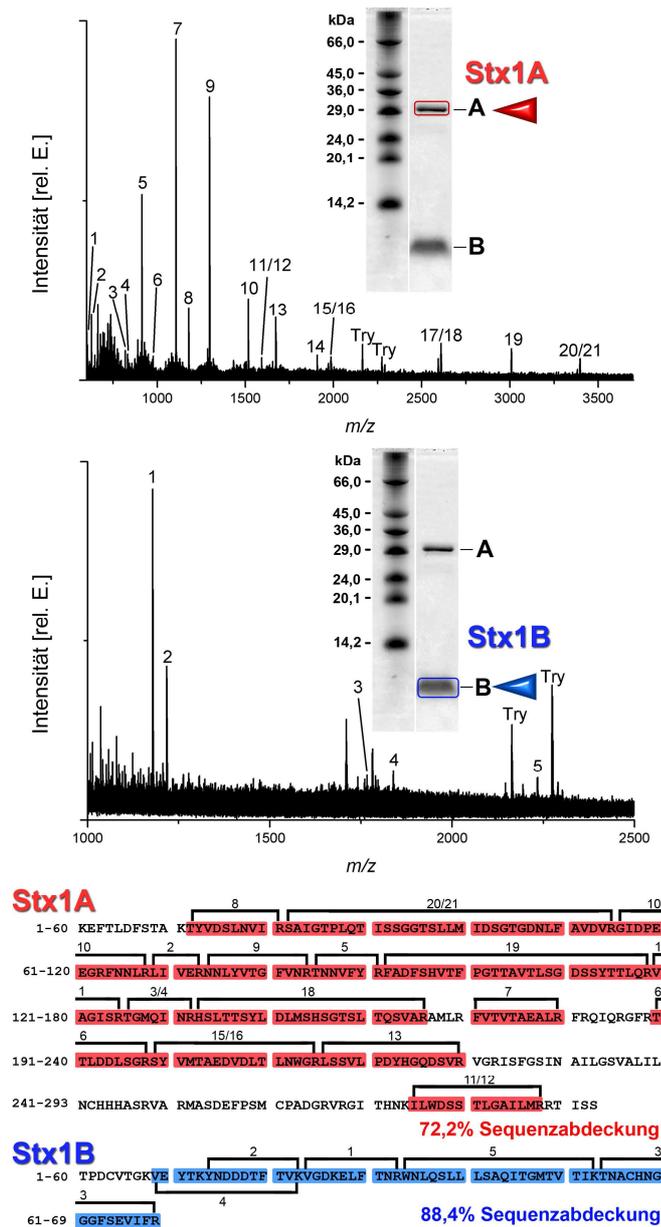


Abbildung 25: Überprüfung der Strukturidentität von Stx1. 3 µg aufgereinigtes Shiga Toxin 1 wurden elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Für die sichtbaren Untereinheiten wurden jeweils durch eine PMF-Analyse die Sequenzen mittels MALDI-TOF MS bestimmt. Abgleiche mit Datenbanken sowie einem theoretischen Verdau der Sequenzen ergaben eine Sequenzabdeckung von 72,2% für Stx1A (in rot dargestellt) sowie von 88,4% für Stx1B (in blau dargestellt). In den Massenspektren sind die nachgewiesenen Fragmente mit arabischen Zahlen bezeichnet und können den jeweiligen Sequenzen im unteren Bildabschnitt zugeordnet werden. Die Sequenzen sind jeweils ohne das potentielle Signalpeptid dargestellt. Stx-unabhängige Trypsin-Autoproteolysefragmente sind mit Try im Spektrum bezeichnet. Die detaillierte Auflistung und Zuordnung der Signale ist **Tabelle 10** und **Tabelle 11** zu entnehmen.

Stx1A

Wie aus **Abbildung 25** ersichtlich ist, konnten 21 Fragmente mit insgesamt 210 von 291 Aminosäuren (AS) der 32,4 kDa großen Stx1A-Untereinheit detektiert werden, was einer Sequenzabdeckung von 72,2% entspricht. Die Stx1A-Fragmente entsprechen dabei den Hauptsignalen des Spektrums. Lediglich zwei schwache Signale von Trypsinautoproteolysefragmenten wurden neben den Stx1A Treffern detektiert. Die exakten Fragmente mit den dazugehörigen m/z -Werten sind **Tabelle 10** zu entnehmen.

Tabelle 10: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von Stx1A nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	602,36	602,36	142-147		0	VAGISR
2	629,40	629,40	91-95		0	LIVER
3	819,41	819,42	148-154		0	TGMQINR
4	835,41	835,41	148-154	Met-ox ²	0	TGMQINR
5	913,45	913,46	107-113		0	TNNVFYR
6	977,49	977,49	202-210		0	TTLDDLGR
7	1106,62	1106,63	183-192		0	FVTVTAEALR
8	1179,64	1179,63	34-43		0	TYVDSLNVIR
9	1296,67	1296,67	96-106		0	NNLYVTGFVNR
10	1516,75	1516,76	78-90		1	GIDPEEGRFNNLR
11	1575,86	1575,86	297-310		0	ILWDSSTLGAILMR
12	1591,85	1591,86	297-310		0	ILWDSSTLGAILMR
13	1672,83	1672,84	228-242		0	LSSVLPDYHGQDSVR
14	1907,05	1907,09	91-106		1	LIVERNLYVTGFVNR
15	1969,93	1969,95	211-227		0	SYVMTAEDVDLTLNWGR
16	1985,93	1985,96	211-227	Met-ox ²	0	SYVMTAEDVDLTLNWGR
17	2592,27	2592,23	155-178		0	HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR
18	2608,27	2608,31	155-178	Met-ox ²	0	HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR
19	3006,45	3006,50	114-141		0	FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR
20	3379,73	3379,71	44-77		0	SAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVR
21	3395,74	3395,70	44-77	Met-ox ²	0	SAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVR

¹im I-Buchstabencode

²oxidiertes Methionin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 21 ppm (engl: *parts per million*).

Stx1B

Es konnten insgesamt 5 Fragmente mit 61 von 69 AS nachgewiesen werden, die sich Stx1B (7,7 kDa) zuordnen ließen. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 88,4% (vgl. **Abbildung 25** und **Tabelle 11**). Zwei Signale stammten von Trypsin-Autoproteolysefragmenten.

Tabelle 11: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von Stx1B nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	1178,62	1178,66	44-53		1	VGDKELFTNR
2	1217,53	1217,57	34-43		0	YNDDDTFTVK
3	1765,81	1766,84	74-89		0	TNACHN ^d GGGFSEVIFR
4	1837,85	1837,93	29-43		1	VEYTKYNDDDTFTVK
5	2233,23	233,22	54-73	Met-ox ²	0	WNLQSLLLSAQITGMTVTIK

¹im 1-Buchstabencode

²oxidiertes Methionin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 44 ppm.

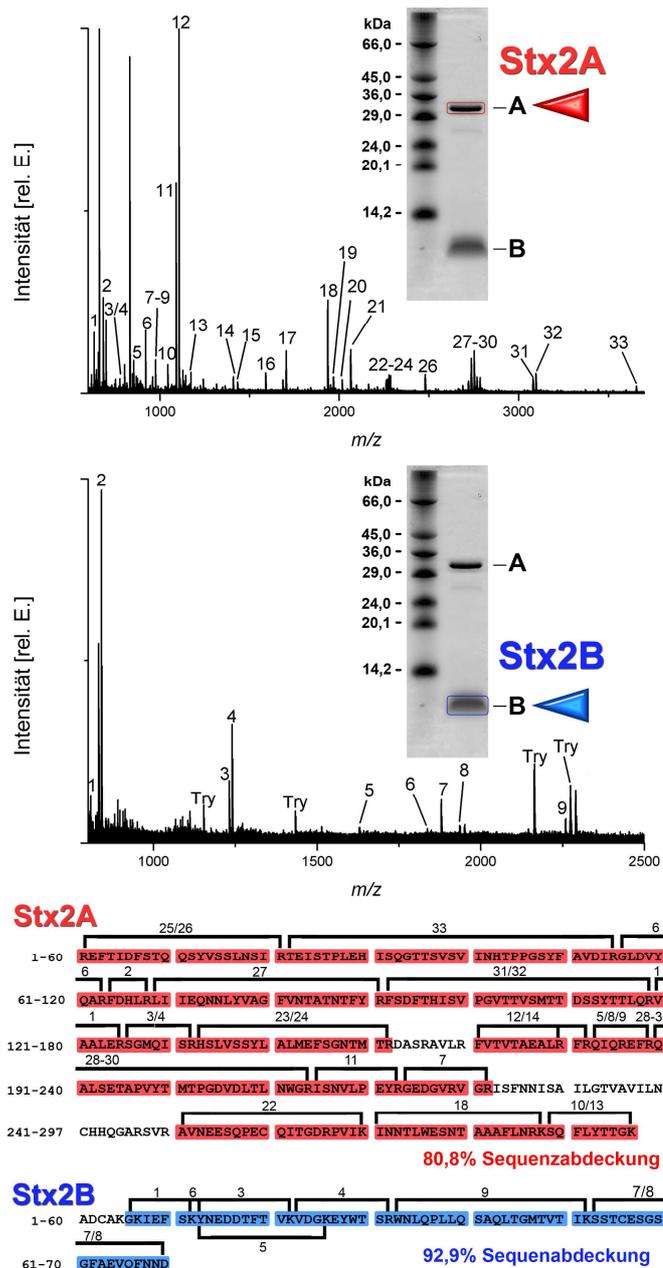


Abbildung 26: Überprüfung der Strukturidentität von Stx2. 3 µg aufgereinigtes Shiga Toxin 2 wurden elektrophoretisch getrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Für die sichtbaren Untereinheiten wurden jeweils durch eine PMF-Analyse die Sequenzen mittels MALDI-TOF MS bestimmt. Vergleiche mit den Datenbanken sowie dem theoretischen Verdau der Sequenzen ergaben eine Abdeckung von 80,8% für Stx2A (in rot dargestellt), sowie 92,9% für Stx2B (in blau dargestellt). Die Zuordnung der nachgewiesenen Fragmente kann anhand der arabischen Zahlen in den Spektren und den jeweiligen Sequenzen erfolgen. Die Sequenzen sind jeweils ohne das potentielle Signalpeptid dargestellt. Stx-unabhängige Trypsin-Autoproteolysesignale sind mit Try im Spektrum bezeichnet. Die detaillierte Auflistung und Zuordnung der Signale ist **Tabelle 12** und **Tabelle 13** zu entnehmen.

Stx2A

Abbildung 26 zeigt, dass für die Stx2A-Untereinheit 33 Fragmente mit insgesamt 260 von 297 AS des 33,2 kDa großen Proteins identifiziert werden konnten, was einer Sequenzabdeckung von 80,8% entspricht. Es wurden keine Autoproteolysefragmente von Trypsin detektiert. Die intensivsten Signale des Spektrums konnten eindeutig Stx2A-Sequenzen zugeordnet werden. Eine Übersicht über die detektierten Fragmente nach tryptischem Verdau von Stx2A gibt **Tabelle 12**.

Tabelle 12: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von Stx2A nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	658,39	658,38	142-147		0	VAALER
2	687,36	687,35	86-90		0	FDHLR
3	778,39	778,38	148-154		0	SGMQISR
4	794,38	794,38	148-154	Met-ox ²	0	SGMQISR
5	847,49	847,03	193-198		1	FRQIQR
6	921,48	921,47	78-85		0	GLDVYQAR
7	944,49	944,43	236-244		1	GEDGVRVGR
8	959,51	959,48	195-201	pyroGlu ³	1	QIQREFR
9	976,53	976,50	195-201		1	QIQREFR
10	1044,54	1044,52	311-319		0	SQFLYTTGK
11	1090,59	1090,58	227-235		0	ISNVLPEYR
12	1106,62	1106,62	183-192		0	FVTVTAEALR
13	1172,63	1172,63	310-319		1	KSQFLYTTGK
14	1409,79	1409,75	183-194		1	FVTVTAEALR
15	1433,75	1433,66	142-154	Met-ox ²	1	VAALERSGMQISR
16	1589,82	1589,78	78-90		1	GLDVYQARFDHLR
17	1703,87	1703,88	227-241		1	ISNVLPEYRGEDGVR
18	1934,97	1934,96	293-309		0	INNTLWESNTAAAFNLR
19	2016,06	2016,01	227-244		2	ISNVLPEYRGEDGVRVGR
20	2244,08	244,04	155-174		0	HSLVSSYLALMEFSGNTMTR
21	2063,07	2063,08	293-310		1	INNTLWESNTAAAFNLRK
22	2213,09	2213,04	273-292		0	AVNEESQPECQITGDRPVIK
23	2260,07	2260,06	155-174	Met-ox ²	0	HSLVSSYLALMEFSGNTMTR
24	2276,07	2276,06	155-174	2 Met-ox ²	0	HSLVSSYLALMEFSGNTMTR
25	2322,12	2322,00	24-43		0	EFTIDFSQSYVSSLNSIR
26	2478,23	2478,16	23-43		0	REFTIDFSQSYVSSLNSIR
27	2661,37	2661,34	91-113		0	LIIEQNNLYVAGFVNTATNTFYR
28	2718,31	2718,33	202-226	pyroGlu	0	QALSETAPVYTMTPGDVDLTLNWGR
29	2734,30	2734,32	202-226	Met-ox ² , pyroGlu ³	0	qALSETAPVYTMTPGDVDLTLNWGR
30	2751,33	2751,35	202-226	Met-ox ²	0	QALSETAPVYTMTPGDVDLTLNWGR
31	3078,47	3078,48	114-141		0	FSDFTHISVPGVTTVSMTTDSSTTLQR
32	3094,47	3094,49	114-141	Met-ox ²	0	FSDFTHISVPGVTTVSMTTDSSTTLQR
33	3653,84	3653,79	44-77		0	TEISTPLEHISQGTTSVINHTPPGSYFAVDIR

¹im 1-Buchstabencode

²oxidiertes Methionin

³Glutamin zu Pyroglutamat

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 63 ppm.

Stx2B

Mittels PMF konnten für Stx2B 9 Fragmente mit 65 von 70 AS nachgewiesen werden, was einer Sequenzabdeckung von 92,9% der 7,8 kDa großen B-Untereinheit entspricht (vgl. **Abbildung 26** und **Tabelle 13**). Neben den Signalen, die Stx2B-Fragmenten zugeordnet werden konnten, wurden zusätzlich drei Trypsin-Autoproteolysefragmente identifiziert.

Tabelle 13: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von Stx2B nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	808,46	808,45	25-31		1	GKIEFSK
2	841,38	841,38	46-51		0	EYWTSR
3	1231,55	1231,53	32-41		0	YNEDDTFTVK
4	1240,60	1240,60	42-51		1	VDGKEYWTSR
5	1630,76	1630,77	32-45		1	YNEDDTFTVKVDGK
6	1835,87	1835,90	27-41		1	IEFSKYNEEDTFTVK
7	1878,75	1878,77	72-89		0	SSTCESGSGFAEVQFNND
8	1935,77	1935,77	72-89	CAM-C ²	0	SSTCESGSGFAEVQFNND
9	2258,22	2258,21	52-71	Met-ox ³	0	WNLQPLLQSAQLTGMTVTIK

¹im 1-Buchstabencode

²Carbamidomethylierung von Cystein

³oxidiertes Methionin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 17 ppm. Die Ergebnisse wurden mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) sowie über das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert.

Bei einem Molekulargewicht von ca. 26-28 kDa konnten weitere, schwach Coomassie gefärbte Banden detektiert werden, welche ebenso wie die A-Untereinheit im Immunoblot mit den monoklonalen Anti-Stx-AK eine Färbung aufwiesen (vgl. **Abbildung 27** für Stx1). Diese konnten ebenfalls den jeweiligen A-Untereinheiten der Toxine zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt, hier A*). Ihrem Laufverhalten im Gel entsprechend handelt es sich bei ihnen um Abbruchfragmente der A-Untereinheiten. Beispielhaft für diese Abbruchbanden wird nachfolgend (**Abbildung 27**) das SDS-Gel in Verbindung mit einer Immunfärbung mittels Anti-Stx1-AK gezeigt.

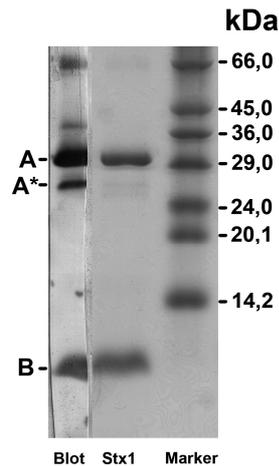


Abbildung 27: Nachweis von Stx1A-Abbruchfragmenten mittels Immunoblot. Westernblot von Stx1 mit dem monoklonalen Anti-Stx1-Antikörper und alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundär-Antikörper. Ca. 1 μ g Stx1 wurden nach der Gelelektrophorese geblottet und immunchemisch gefärbt (linke Spur). 2 μ g wurden im Kontroll-SDS-Gel geladen (mittlere Spur). Als Referenz diente eine Mischung aus Markerproteinen (rechte Spur). Die auch im Immunoblot intensiv gefärbte Abbruchbande von Stx1A ist mit A* bezeichnet.

7.1.2 EHEC-Hly

Das EHEC-Hämolyysin wurde von Dr. Thomas Aldick in *E. coli*s exprimiert, aufgereinigt und für Strukturanalyse in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Dazu wurden 2 μ g des aufgereinigten EHEC-Hly im SDS-Gel elektrophoretisch getrennt, mit Coomassie Blau gefärbt und mittels PMF analysiert. Die gefärbte Bande wurde ausgeschnitten, getrocknet und chemisch reduziert und alkyliert. Anschließend wurde das modifizierte EHEC-Hly über Nacht mit Trypsin verdaut und die entstandenen Peptide nach Extraktion und Aufreinigung für die massenspektrometrischen Analysen verwendet. Zur Sequenzbestätigung wurden die Ergebnisse mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) sowie über das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert. Die Ergebnisse des PMF sind in der nachfolgenden **Abbildung 28** dargestellt.

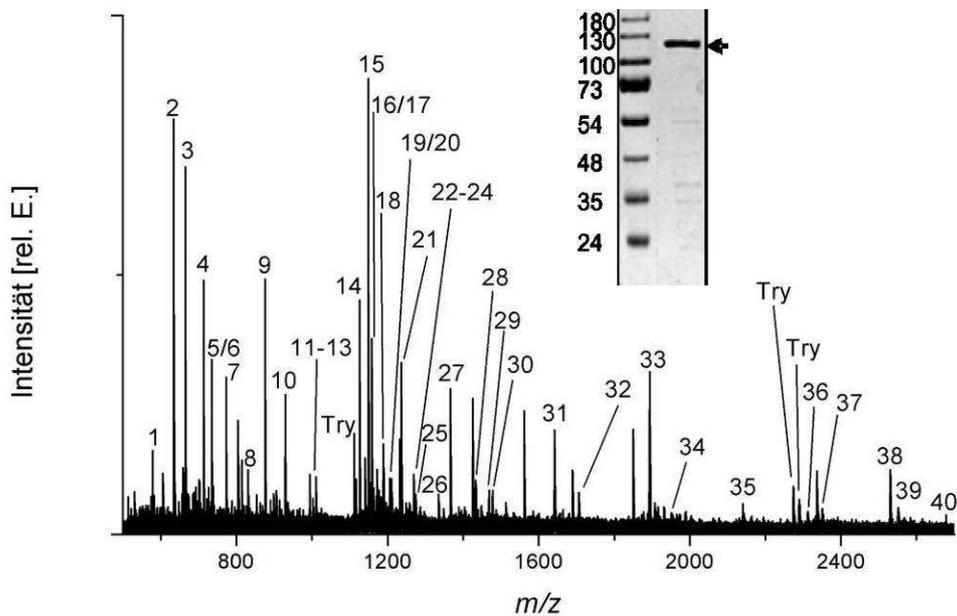


Abbildung 28: UV-MALDI-o-TOF Spektrum des tryptisch-verdauten EHEC-Hly. Die tryptischen Peptide wurden nach In-Gel-Verdau und Aufarbeitung eingedampft und in 10 μ l 50%igem ACN resuspendiert. 0,5 μ l dieses Ansatzes wurden mit 1 μ l DHB vermischt, auskristallisiert und mittels UV-MALDI-o-TOF MS vermessen. Die arabischen Ziffern bezeichnen zugeordnete Fragmente des tryptischen Verdau von EHEC-Hly. Mit Try sind Autoproteolysefragmente von Trypsin beschriftet.

Für das EHEC-Hly konnten 40 Fragmente mit 360 von 998 Aminosäuren nachgewiesen und identifiziert werden, was einer Sequenzabdeckung von 36,1% des 104 kDa großen Proteins entspricht. Das aufgenommene Spektrum ist in **Abbildung 28** dargestellt, die Peptidsignale in **Tabelle 14** und die Sequenzzuordnung in **Abbildung 29**.

Tabelle 14: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von EHEC-Hly nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	579,33	579,32	680-683		0	(K)IQYR(D)
2	634,28	634,32	1-5	1Acetyl ²	0	(-)MTVNK(I)
3	665,34	665,34	897-901		0	(K)NWFQK(D)
4	713,33	713,33	684-688		0	(R)DFEFR(T)
5	735,36	735,37	563-568		0	(K)DTWSVK(G)
6	739,38	739,38	452-457		0	(R)QHAFER(A)
7	773,45	773,45	85-91		0	(K)VVGLTER(G)
8	831,39	831,39	575-581		0	(K)GVYDYSK(L)
9	876,51	876,52	582-588		0	(K)LIQFVEK(N)
10	929,53	929,54	470-478		0	(K)IGELAGITR(N)
11	994,45	994,45	321-328	pyro-Glu ³	0	(K)QLESYSER(F)
12	1003,51	1003,52	868-876		0	(R)VGNDLIMNK(A)
13	1011,48	1011,47	321-328		0	(K)QLESYSER(F)
14	1126,54	1126,55	19-29		0	(K)SAFNTASSSVR(S)
15	1148,63	1148,64	272-281		0	(K)AVSQYILAQR(M)
16	1158,64	1158,65	92-102		0	(R)GVAIFAPQLDK(L)
17	1172,55	1172,54	401-410	pyro-Glu ³	0	(K)QAMFEHVAEK(F)
18	1189,54	1189,57	401-410		0	(K)QAMFEHVAEK(F)
19	1205,55	1205,56	401-410	1Met-ox ⁴	0	(K)QAMFEHVAEK(F)
20	1210,58	1210,61	319-328		1	(R)AKQLESYSER(F)
21	1236,64	1236,66	8-18		0	(K)NIFNNATLTTK(S)
22	1248,55	1248,53	425-434		0	(K)NYFENGYDAR(H)
23	1269,60	1269,61	321-330	pyro-Glu ³	1	(K)QLESYSERFK(K)
24	1269,60	1269,62	415-424		1	(R)INWEKEHEGK(N)
25	1286,60	1286,64	321-330		1	(K)QLESYSERFK(K)
26	1335,63	1335,68	924-934		1	(K)VDKIPHNNSR(S)
27	1366,65	1366,66	505-515		0	(K)EFTQQVFPQK(G)
28	1433,70	1433,70	551-562	1Met-ox ⁴	0	(K)YEYMTSLIVNGK(D)
29	1468,67	1468,69	962-975		0	(K)IISVSGFDSGDER(L)
30	1477,79	1477,84	6-18		1	(K)IKNIFNNATLTTK(S)
31	1640,90	1640,97	92-106		1	(R)GVAIFAPQLDKLLQK(Y)
32	1705,85	1705,90	921-934		2	(R)EIKVDKIPHNNSR(S)
33	1892,93	1892,98	488-504		0	(K)AYINYLENGGLEAQP(K)
34	1951,05	1951,04	329-345		2	(R)FKKLNIEGDALLAGFHK(E)
35	2138,99	2139,07	877-896		0	(K)AINGVLSFNESNDVNGITFK(N)
36	2311,18	2311,29	35-55		0	(K)LILLIPDNYEAQGVGINELVK(A)
37	2349,05	2349,17	940-961	1Met-ox ⁴	1	(K)ASNIASEKNMNVNITSVANDINK(I)
38	2529,23	2529,29	976-998		0	(R)LASLYNLSLHQNNTHSTLTTTV(-)
39	2550,15	2550,25	547-568	1Met-ox ⁴	2	(K)QSGKYEYMTSLIVNGKDTWSVK(G)
40	2677,40	2677,42	128-153	1Met-ox ⁴	0	(K)AGTVLSALQNFTGIALSGMALDELLR(K)

¹im 1-Buchstabencode²Acetylierung³Glutamin zu Pyroglutamat⁴oxidiertes Methionin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 63 ppm.

Die Ergebnisse wurden mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) sowie über das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert.

Abbildung 29 zeigt die graphische Darstellung der Sequenzabdeckung mit den identifizierten Fragmenten des tryptisch verdauten EHEC-Hly. Die mittels PMF identifizierten Sequenzen sind rot hervorgehoben.

```

1-60  MTVNKIKNIF  NNATLTKSA  FNTASSSVRS  AGKKLLLLIP  DNYEAQGVGI  NELVKAADEL
61-120  GIEIHRTERD  DTAIANOFFG  AAEKVVGLTE  RGVAIFAPOL  DKLLOKYQKV  GSKIGGTAEN
121-180  VGNNLGKACT  VLSALQNFTG  TALSGMALDE  LLRKQREGED  ISQNDIAKSS  IELINQLVDT
181-240  VSSINSTVDS  FSEQLNQLGS  FLSSKPRLSS  VGGKLQNLPD  LGPLGDGLDV  VSGILSAVSA
241-300  SPILGNSDAH  TGTKAAAGIE  LTTQVLGNVG  KAVSQYILAO  RMAQGLSTTA  ASAGLITSAV
301-360  MAISPLSFL  AAADKFERAK  QLESYSERFK  KINYEGDAIT  ACFHKETGAI  DAGLTTINTV
361-420  LSSVSAGVSA  ASSASLIGAP  ISMLVSSALTG  TISGILEASK  QAMFEHVAEK  FAARINEWEK
421-480  EHGKNYFENG  YDARHAAFLE  DSLSLLADFS  ROHAVERAVA  ITHQHWDEKI  GELAGITRNA
481-540  DRSQSGKAYI  NYLENGLLLE  AQPKEFTQQV  FDPQKGTIDL  STGNVSSVLT  FITPTFTPGE
541-600  EVRERKQSCK  YEYMTSLIVN  CKDTWSVEKI  KNHKGVYDYS  KLIQFVEKNT  KHYQARIISE
601-660  LGDKDDVVYS  GAGSSEVFAG  EGYDPVSYNK  TDVGKLTIDA  TGAPKPGEYI  VPKNMYGDVE
661-720  VLQEVVKEQE  VSVGKRTEKI  QYRDFEFRTG  GIPYDVIDNL  HSVEELIGGK  HDEFKGGKF
721-780  NDIFHGADGN  DYIEGNYGND  RLYGDDGDDY  ISGGQGDDQL  FGGSGNDKLS  GGDGNNYLTG
781-840  GSGNDELQAH  GAYNILSGGT  GDDKLYGGGG  IDLLDGGEGN  DYLNGGFND  IYVYQNYGH
841-900  HTIADEGGKG  DRHLSDISF  DDIAFKRVGN  DLIMKAING  VLSFNESNDV  NGITFKNWFA
901-960  KDASGADNHL  VEVITDKDGR  EIKVDKIPHN  NNERSGYIKA  SNIASEKNMV  NITSVANDIN
961-998  KLISSVSGFD  SGDERLASLY  NLSLHQNNTH  STLLLTTV

```

36,1% Sequenzabdeckung

Abbildung 29: Mittels PMF ermittelte Sequenzabdeckung von tryptisch-verdautem EHEC-Hly. 2 µg aufgereinigtes EHEC-Hly wurden im Gel tryptisch verdaut, chemisch modifiziert, extrahiert und über ZipTipC18-Chromatographie aufgereinigt. Für die Präparation wurden 0,5 µl des aufgereinigten Verdaus mit 1 µl DHB gemischt und auskristallisiert. Rot unterlegt sind die identifizierten Fragmente des tryptisch-verdauten EHEC-hly.

7.1.3 EspP

Die Protease EspP wurde von Dr. Jens Brockmeyer in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und zur Identifizierung zur Verfügung gestellt. Drei µg des Proteins wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Coomassie Blau gefärbt und nach tryptischem Verdau mittels PMF massenspektrometrisch durch nanoESI Q-TOF MS sowie UV-MALDI-o-TOF MS strukturell charakterisiert. Die Instrumente verwenden zwei verschiedene Arten der Ionisierung und führen so im Verlauf der Messung zu unterschiedlichen Spektren. Dieses Faktum wurde im folgenden Ansatz ausgenutzt, um eine möglichst hohe Sequenzabdeckung des In-Gel-Verdaus von EspP zu erhalten.

In **Abbildung 30** ist exemplarisch ein Spektrum des EspP-In-Gel-Verdau gezeigt, das mittels nanoESI Q-TOF MS erstellt wurde. Die meisten Signale konnten anhand der Datenbankabgleiche oder mittels Vergleich mit dem theoretischen Verdau identifiziert werden. Die nicht zugeordneten Signale könnten auf posttranslationalen Modifikationen des Proteins beruhen, wie z. B. Sulfatierungen oder Phosphorylierungen. Diese könnten bei Bedarf in weiteren Experimenten, beispielsweise per Tandem-MS, genauer untersucht werden.

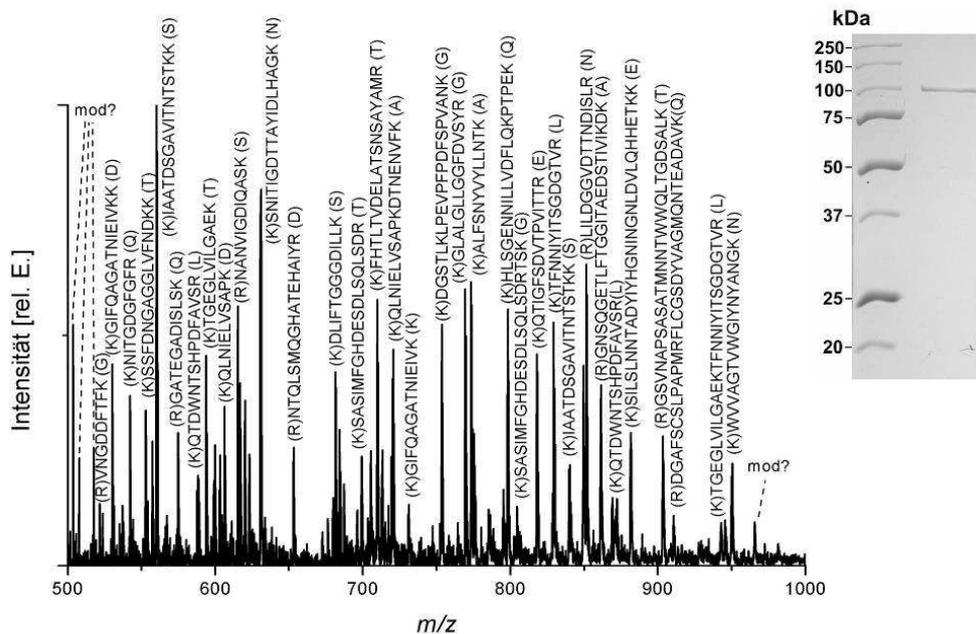


Abbildung 30: nanoESI-Q-TOF Spektrum von Trypsin-verdaulichem EspP. 4 μ l des aufgereinigten In-Gel-Verdau wurden mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH gemischt und für die nanoESI Q-TOF-Massenspektrometrie verwendet. Die identifizierten Signale sind mit den jeweiligen zugeordneten Sequenzen beschriftet. In den Klammern sind bei jedem Fragment jeweils links und rechts die letzte Aminosäure des C-terminal benachbarten Fragments und die direkt auf die Sequenz folgende Aminosäure (1. AS des N-terminal benachbarten Fragments) mit angegeben. Nicht identifizierte Signale sind mit einem „mod?“ gekennzeichnet und könnten im Weiteren auf posttranslationale Modifikationen hin untersucht werden.

Das summarische Ergebnis der Kombination aus beiden MS-Techniken ist in der nachfolgenden **Abbildung 31** dargestellt. Mittels UV-MALDI-o-TOF MS identifizierte Sequenzen sind blau unterlegt und die mit Hilfe der nanoESI Q-TOF MS nachgewiesenen Fragmente grün. Alle Sequenzen, die mit beiden Ionisierungsarten nachgewiesen werden konnten, sind rot hervorgehoben.

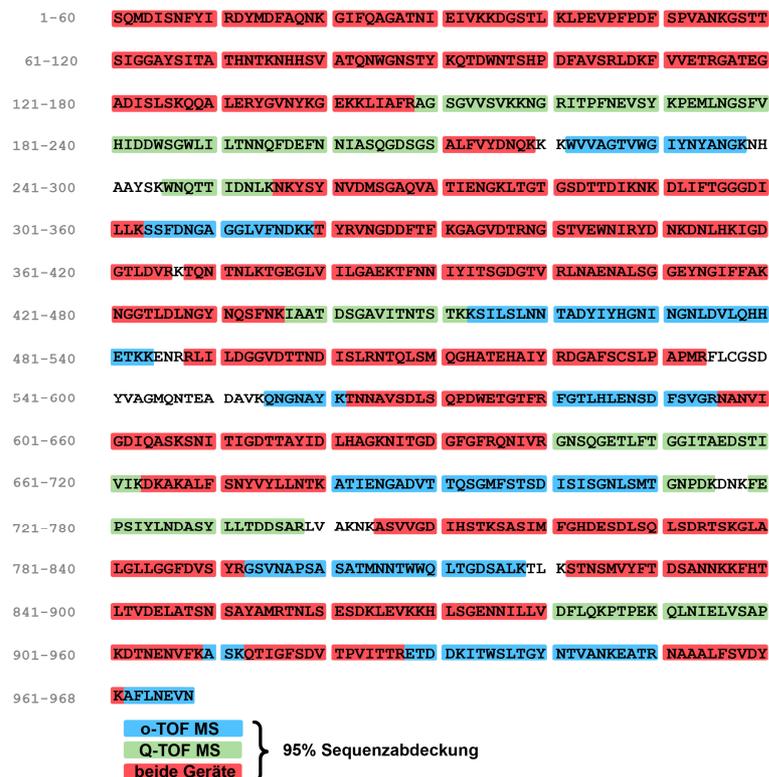


Abbildung 31: Mittels PMF ermittelte Sequenzabdeckung von tryptisch-verdaulichem EspP.

3 µg aufgereinigtes EspP wurden im Gel tryptisch verdaut, chemisch modifiziert, extrahiert und aufgereinigt. Blau unterlegt sind die Fragmente von EspP, die ausschließlich mittels MALDI-o-TOF MS detektiert wurden. Grün unterlegt sind die tryptischen Fragmente, die ausschließlich mittels nanoESI Q-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. Mit jeweils beiden Geräten konnten die rot unterlegten Fragmente detektiert werden. Für die UV-MALDI-o-TOF Präparation wurden 0,5 µl des über ZipTips aufgereinigten und konzentrierten Verdaus mit 1 µl DHB gemischt und auskristallisiert. Vier µl des aufgereinigten Verdaus wurden mit 4 µl MeOH und 1 µl HCOOH gemischt und für die Elektrospray verwendet.

Wie in **Abbildung 31** dargestellt, konnten 614 der 968 AS, was einer Sequenzabdeckung von 63,4% der Aminosäuresequenz entspricht, mit beiden Techniken identifiziert werden, 120 von 968 AS (12,4%) ausschließlich mittels o-TOF MS und 185 von 968 AS (19,1%) mittels Q-TOF MS. Für das Gesamtmolekül konnte somit mit 919 von 968 AS eine Sequenzabdeckung von 95% des 107 kDa großen Proteinserzielt werden. Eine solch hohe Abdeckung erlaubt, neben der sicheren Identifizierung des Proteins, falls von Interesse, eine sehr gezielte Suche nach posttranslationalen Modifikationen des Moleküls.

Das Ergebnis der UV-MALDI-o-TOF Messungen wurde mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) und mit Hilfe des Programms ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) verifiziert. Die nanoESI Q-TOF MS Ergebnisse wurden über Tandem-MS Experimente von ausgewählten Signalen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

7.1.4 Cdt

Die gelelektrophoretisch getrennten und nach Coomassie Blau-Färbung ausgeschnittenen Proteinbanden von CdtA, B und C wurden von Frau PD Dr. Martina Bielaszewska zu analytischen Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt. Die Proteine wurden mit ACN getrocknet, chemisch modifiziert und anschließend tryptisch verdaut. Nach Extraktion und Aufreinigung wurden die Peptidgemische in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und in 10 µl 50%igem ACN resuspendiert. 0,7 µl dieses Ansatzes wurden mit 1 µl DHB auskristallisiert und mittels UV-MALDI-o-TOF MS vermessen. Die Ergebnisse der UV-MALDI-o-TOF MS Experimente wurden mittels Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) und unter Zuhilfenahme des Programms ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert.

Beispielhaft für die PMF, welche zum Strukturbeweis der verschiedenen Untereinheiten des Cdt-Holotoxins durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse des CdtB-Verdaus in der nachfolgenden **Abbildung 32** dargestellt und in **Tabelle 15** aufgelistet.

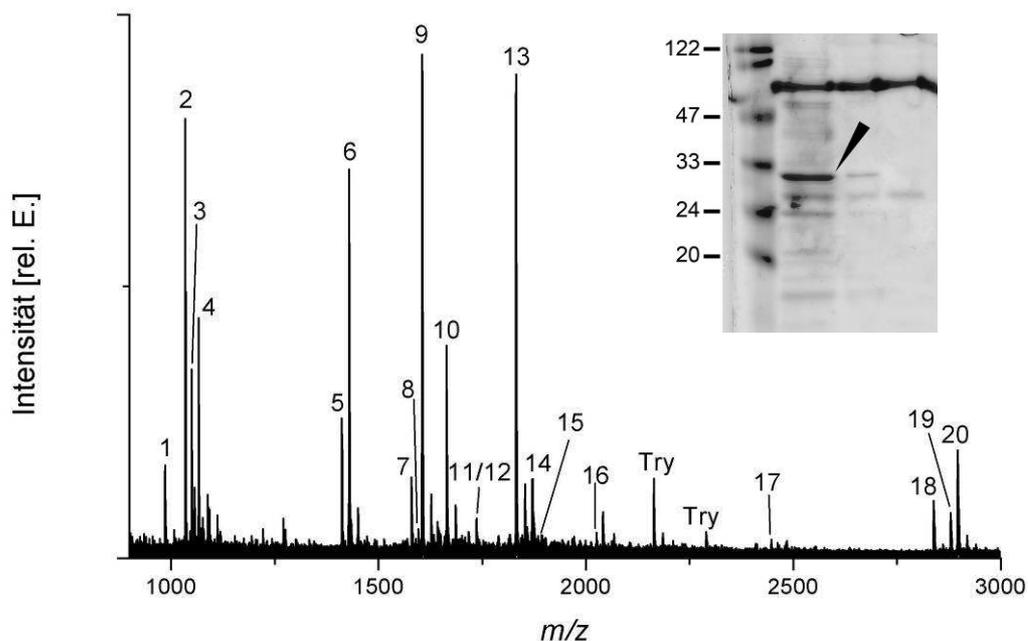


Abbildung 32: UV-MALDI-o-TOF Spektrum des mittels In-Gel-Verdau von CdtB erhaltenen Peptidgemisches. Das Gemisch der tryptischen Peptide wurde nach Verdau und Aufarbeitung eingedampft und in 10 μ l 50%igem ACN resuspendiert. 0,7 μ l dieses Ansatzes wurden mit 1 μ l DHB vermischt, auskristallisiert und mittels UV-MALDI-o-TOF MS vermessen. Die arabischen Ziffern bezeichnen die identifizierten Peptidfragmente von CdtB. Mit Try sind Autoproteolysefragmente von Trypsin gekennzeichnet.

Nach tryptischem Verdau der CdtB-Untereinheit konnten 20 Fragmente mit insgesamt 214 von 269 AS identifiziert werden, was einer Sequenzabdeckung von 79,6% entspricht. Die intensivsten Signale des Spektrums konnten, mit Ausnahme von zwei Autoproteolysefragmenten des Trypsins, der CdtB-Sequenz zugeordnet werden. Die folgende **Tabelle 15** gibt Aufschluß über die genaue Zuordnung der identifizierten Signale zu den entsprechenden AS-Sequenzausschnitten des CdtB.

Tabelle 15: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von CdtB nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	985.58	985.59	114-122		0	(R)VNLALVSNR(Q)
2	1034.64	1034.65	76-85		0	(R)VIPSPGIPVR(E)
3	1049.62	1049.63	135-144	pyro-Glu ²	0	(R)QGGRPLLGR(I)
4	1066.65	1066.66	135-144		0	(R)QGGRPLLGR(I)
5	1411.77	1411.78	123-134	pyro-Glu ²	0	(R)QADEVFVLRPVR(Q)
6	1428.80	1428.81	123-134		0	(R)QADEVFVLRPVR(Q)
7	1579.72	1579.72	255-268	1Met-ox ³	0	(R)TQMSSDHYPVGVSR(R)
8	1595.83	1595.83	196-209		0	(R)EPDDLEVNLTPVR(N)
9	1604.82	1604.82	145-159		0	(R)IGNDAFFTAHALATR(N)
10	1663.83	1663.83	25-40		0	(R)VATWNLQGASATTESK(W)
11	1735.82	1735.82	254-268	1Met-ox ³	1	(R)RTQMSSDHYPVGVSR(R)
12	1735.82	1735.82	255-269	1Met-ox ³	1	(R)TQMSSDHYPVGVSR(-)
13	1830.93	1830.94	210-226		0	(R)NASEIIFPAAPTQTSQR(T)
14	1870.90	1870.90	160-175		0	(R)NNDAPALVEEVYFFR(D)
15	1891.92	1891.88	254-269	1Met-ox ³	2	(R)RTQMSSDHYPVGVSR(-)
16	2026.00	2026.07	179-195		0	(R)DPVHQAINWMLGDFNR(E)
17	2446.25	2446.19	25-46		1	(R)VATWNLQGASATTESKWNINVR(Q)
18	2837.51	2837.53	227-253		0	(R)TLDYAVAGNAVAFRPFPLQAGIVYGAR(R)
19	2878.44	2878.50	47-75	pyro-Glu ²	0	(R)QLISGENAVDILAVQEAGSPSTAVDTGR(V)
20	2895.47	2895.44	47-75		0	(R)QLISGENAVDILAVQEAGSPSTAVDTGR(V)

¹im 1-Buchstabencode²Glutamin zu Pyroglutamat³oxidiertes Methionin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 35 ppm. Die graphische Zuordnung der Sequenzen für das gesamte Protein ist in **Abbildung 33** gezeigt.

1-60 MKKYIISLIV FLSFYAQADL TDFR**VATWNL** QGASA**TTESK** **WNINVRQLIS** **GENAVDILAV**

61-120 **QEAGSPSTA** **VDTGRVIPSP** **GIPVRELIWN** LSTNSRPQQV YIYFSAVDAF GGR**VNLALVS**

121-180 **NRQADEVFVL** **RPVRQGGRPL** **LGIRIGNDAF** **FTAHAIATR** **NDAPALVEEV** **YSFFRDSRDP**

181-240 **VHQAINWML** **GDFNREPDDL** **EVNLTPVRN** **ASEIIFPAAP** **TQTSQRTLDY** **AVAGNAVAFR**

241-269 **PFPLQAGIVY** **GARRTQMSSD** **HYPVGVSR** **79,6% Sequenzabdeckung**

Abbildung 33: Sequenzabdeckung von Trypsin-verdaulichem CdtB. Ca. 1 µg aufgereinigtes CdtB wurde im Gel tryptisch verdaut, chemisch modifiziert, extrahiert und über ZipTipC18-Chromatographie aufgereinigt. Für die Präparation wurden 0,5 µl des aufgereinigten Verdauansatzes mit 1 µl DHB gemischt und auskristallisiert. Rot unterlegt sind die identifizierten Verdaufragmente von CdtB.

214 der 269 AS des CdtB wurden nach In-Gel-Verdau massenspektrometrisch identifiziert. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 79,6% des 29,753 kDa großen Proteins. Das CdtA wurde mit 126 von 258 AS (48,8%) bei einer Größe von 27,845 kDa in seiner Identität bestätigt, das CdtC mit 56 von 181 AS (30,9%) bei 19,974 kDa (Daten nicht gezeigt).

7.1.5 SfpA

Die Coomassie Blau-gefärbten Banden zum massenspektrometrischen Strukturbeweis der SfpA-Untereinheit aus aufgereinigten Sfp-Fimbrien wurden von Frau Dipl. Biotech. Anne Müsken zur Verfügung gestellt. Da in der Aminosäuresequenz der SfpA Untereinheit nur wenige Trypsin-Schnittstellen vorhanden sind, wurden zwecks höherer Sequenzabdeckung ein Einzelverdau mit Trypsin sowie ein kombinierter Verdau mit Trypsin und der Endoprotease Glu-C durchgeführt. Trypsin schneidet C-terminal hinter Arg und Lys, Glu-C hingegen C-terminal hinter den beiden sauren Aminosäuren Asp und Glu. Nach dem Verdau wurden die Proben mittels UV-MALDI-o-TOF MS vermessen. Die m/z -Werte mit den zugehörigen Fragmenten aus beiden MS-Ansätzen des Trypsin- sowie Trypsin- und Glu-C-Verdaus sind in **Tabelle 16** summarisch aufgelistet.

Tabelle 16: Summarische Auflistung der mittels UV-MALDI-o-TOF MS identifizierten Peptidsignale von SfpA nach Trypsin- sowie Trypsin- und Glu-C-Verdau.

$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
659.4	659.4	153-159		0	AIGGTLK
861.5	861.4	73-79		1	IKLVNCD
862.5	862.5	111-119		0	TGTAVVVS
911.5	911.5	146-152		1	YSTWVKK
999.6	999.6	137-145		0	LQAGDNILR
1138.6	1139.6 ²	58-68	Deam ²	1	AHLEAN ² GISVK
1145.6	1145.6	73-81	CAM-C ³	1	IKLVNCDVK
1381.7	1381.8	91-103		0	VSFTGTTINSQVK
1407.8	1407.8	142-152		2	NILRYSTWVKK
1488.8	1488.7	70-81	CAM-C ³	1	DLDIKLVNCDVK
1690.8	1690.8	160-174		1	EGDFTA VANFNLTYS
1799.0	1798.9	52-68		2	FGQISKAHLEANGISVK
2701.4	2701.3	32-57		1	GHIINAPCGIAPESADQSIDFGQISK
3067.5	3067.5	104-136		2	ELGTAGDTGTAVVSEASGNLVSFDGVAGSATK

¹im 1-Buchstabencode

²Desamidierung von Asparagin

³Caramidomethylierung von Cystein

Die Schnittstellen der Protease Trypsin (R = Arg und K = Lys) sind in Grau markiert, die Fragmente, die zusätzlich durch den Einsatz der Endoprotease Glu-C erzeugt wurden (D = Asp und E = Glu) sind in Schwarz mit weißer Schrift unterlegt. Die summe aller detektierten und identifizierten Fragmente ergibt die in **Abbildung 34** gezeigte 81%ige Sequenzabdeckung für SfpA.

1-60 MKKTILGLII SFGLCSAVNA ASQQGIINF **KGIIINAPCG** **IAPESADQSI** **DFGQISKAHL**
61-120 **EANGISVKKD** **LDIKLVNCDV** **KELASTGSVK** **VSFTGTTINS** **QVKELGTAGD** **TGTAVVSEA**
121-174 **SGNLVSFDGV** **AGSATKLQAG** **DNILRYSTWV** **KKAIGGTLKE** **GDFTAVANFN** **LTYE**

81,0% Sequenzabdeckung

Abbildung 34: Sequenzabdeckung von Trypsin und Trypsin/Glu-C-verdaulichem SfpA nach summarischer Auflistung der identifizierten Fragmente. Ca. 0,5 µg gelelektrophoretisch getrenntes SfpA wurde im Gel tryptisch verdaut, chemisch modifiziert, extrahiert und über ZipTipC18-Chromatographie aufgereinigt. Für die Präparation wurde 1 µl des aufgereinigten Verdauansatzes mit 1 µl DHB gemischt und auskristallisiert. Rot unterlegt sind identifizierte tryptisch-verdaute Fragmente von SfpA.

Mit Hilfe der Kombination von zwei Verdauansätzen und der insgesamt erzeugten Peptidfragmente konnten 14 Fragmente, die 141 von 174 AS erfassen, identifiziert werden. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 81% der 17,93 kDa großen SfpA-Untereinheit.

Die Ergebnisse der UV-MALDI-o-TOF MS Experimente wurden mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) sowie über das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert.

7.1.6 EibG

Ein Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* 3671/97 wurde von Dr. Barbara Ohder in zwei parallelen Ansätzen per SDS-Gelelektrophorese getrennt. Der Kontrollansatz wurde mittels Western-Blot und anschließender Immunfärbung mit einem Anti-EibG-Antikörper angefärbt, so dass über einen Höhenvergleich des EibG im Gel bestimmt und die korrespondierende Bande aus dem originalen Gel ausgeschnitten werden konnte. Die Coomassie Blau-gefärbte Bande wurde anschließend mittels PMF und MALDI-o-TOF MS analysiert. Das resultierende Spektrum der MS-Analyse des Verdaus ist in **Abbildung 35** gezeigt, die identifizierten Peptidfragmente sind in **Tabelle 17** aufgelistet.

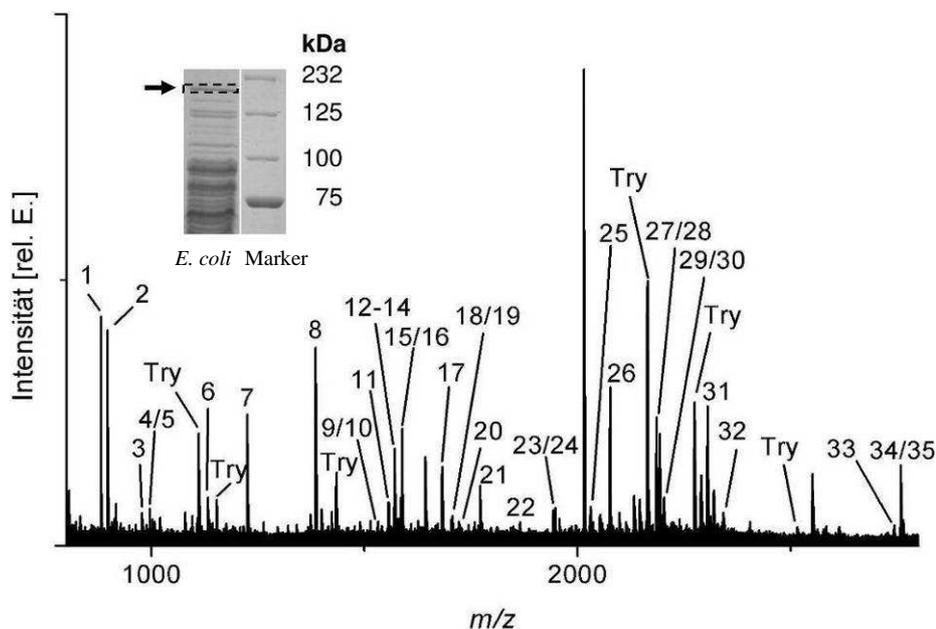


Abbildung 35: MALDI-TOF Massenspektrum von Trypsin-verdaulichem EibG. Die zur EibG-Immunfärbung korrespondierende Bande aus dem Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* 3671/97 (*E. coli*) wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, getrocknet, chemisch modifiziert und über Nacht mit Trypsin verdaut. Der tryptische Verdau wurde nach Extraktion und Aufarbeitung eingedampft und in 10 μ l 50%igem ACN resuspendiert. 0,7 μ l dieses Ansatzes wurden mit 1 μ l DHB vermischt, auskristallisiert und im o-TOF MS vermessen. Die arabischen Ziffern bezeichnen zugeordnete Fragmente des tryptischen Verdaus von EibG. Mit Try sind Autoproteolysefragmente von Trypsin beschriftet. Zum Größenvergleich wurde ein Proteinmarker verwendet (Marker).

Es konnten 35 der detektierten Signale Sequenzfragmenten von EibG zugeordnet werden, was 265 von 508 AS und somit einer Sequenzabdeckung von 52,2% entspricht. Aufgrund der nur schwach Coomassie Blau-gefärbten Bande muss von einer sehr geringen Proteinmenge ausgegangen werden, was die zahlreichen Autoproteolysefragmente von Trypsin erklärt (vgl. **Abbildung 35**). Da die eingesetzte Menge des Trypsins im Verhältnis zur Größe des Gelstückes steht und nicht in Abhängigkeit zur Menge des zu analysierenden Proteins, erhöht eine geringe Proteinkonzentration die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Enzymmoleküle gegenseitig verdauen. Das nach Gensequenz 54 kDa große EibG ist in der Gelelektrophorese bei einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa detektiert worden, so dass für das EibG eine Tetramer-Struktur postuliert wird (Ohder 2009). Die identifizierten EibG-Fragmente sind in der nachfolgenden **Tabelle 17** aufgelistet und ihren Sequenzen zugeordnet. Die graphische Darstellung der Sequenzabdeckung ist in **Abbildung 36** gezeigt.

Tabelle 17: Mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektierte Peptidsignale von EibG nach Trypsin-Verdau.

Peak	$m/z_{\text{theor.}}$ [M+H] ⁺	$m/z_{\text{exp.}}$ [M+H] ⁺	Position	Modifikation	übersprungene Schnittstellen	Sequenz ¹
1	881,40	881,39	65-72		0	SSGWGTMR
2	897,39	897,39	65-72	1 Met-ox ²	0	SSGWGTMR
3	978,48	978,48	414-421	pyroGlu ³	0	QLQEHNAR
4	988,52	988,42	270-279		0	NSVALGANSR
5	995,50	995,49	414-421		0	QLQEHNAR
6	1132,57	1132,56	404-413		0	NTQAIQSNTNTR
7	1225,65	1225,65	35-45		0	DSGLPFYSVLK
8	1385,78	1385,78	373-386		0	TLAVNDGLVALSGR
9	1530,80	1530,77	387-400		2	TDRIDAAVGSVDRR
10	1538,77	1538,66	111-124		2	DFARMAAGLRTSDK
11	1556,70	1556,71	46-59		0	EADASHVTYGSTYR
12	1570,76	1570,77	158-172	pyroGlu ³	0	QSAFIASGPRPEGDR
13	1571,76	1571,80	65-78	1 Met-ox ²	1	SSGWGTMRVVLNGK
14	1578,74	1578,76	60-72	1 Met-ox ²	1	IYYNKSSGWGTMR
15	1585,82	1585,80	97-110		0	DNSIAYTVHEPVLK
16	1587,79	1587,79	158-172		0	QSAFIASGPRPEGDR
17	1681,95	1681,94	143-157		0	VNNLSNTIINPEILK
18	1703,86	1703,85	324-338		1	VKDSVEQLAQDTNTR
19	1704,85	1704,93	414-427	pyroGlu ³	1	QLQEHNARLNSQQR
20	1721,88	1721,87	414-427		1	QLQEHNARLNSQQR
21	1771,93	1771,94	302-319		0	VLGGLSDGTRPSDAATVR
22	1863,94	1863,94	354-372		1	TTVGVNSDGTLTRAEGASK
23	1941,92	1941,93	280-296		1	TTRDNEVYIGYEAEPGK
24	1945,92	1945,89	283-299		1	DNEVYIGYEAEPGKAYK
25	2029,08	2029,10	300-319		1	TRVLGGLSDGTRPSDAATVR
26	2075,06	2075,05	97-114		1	DNSIAYTVHEPVLKDFAR
27	2184,24	2184,23	139-157		1	IFNKVNNLSNTIINPEILK
28	2185,08	2185,21	320-338	pyroGlu ³	2	QVDRVKDSVEQLAQDTNTR
29	2202,11	2202,05	320-338		2	QVDRVKDSVEQLAQDTNTR
30	2203,07	2203,04	283-301		2	DNEVYIGYEAEPGKAYKTR
31	2304,11	2304,14	280-299		2	TTRDNEVYIGYEAEPGKAYK
32	2340,34	2340,31	138-157		2	RIFNKVNNLSNTIINPEILK
33	2741,45	2741,37	373-399		2	TLAVNDGLVALSGRTDRIDAAVGSVDR
34	2756,41	2758,36 ⁴	73-96	Deam ⁴	1	YVLN ⁴ GKDETLFNFDQEGN ⁴ IIVLSK
35	2763,33	2763,26	35-59		1	DSGLPFYSVLKEADASHVTYGSTYR

¹im 1-Buchstabencode²oxidiertes Methionin³Glutamin zu Pyroglutamat⁴Desamidierung von Asparagin

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 102 ppm.

Die Ergebnisse der UV-MALDI-o-TOF MS Experimente wurden mit einer Datenbanksuche über ALDENTE (*peptide mass fingerprinting tool*, ExPaSy) sowie über das Programm ProteinProspector (v5.2.2, *University of California*) überprüft und verifiziert.

Eine graphische Zuordnung der identifizierten Sequenzfragmente, die aus der PMF-Analyse resultieren, ist in der nachfolgenden **Abbildung 36** dargestellt. In Rot unterlegt sind die einzelnen Sequenzabschnitte, die mittels UV-MALDI-o-TOF MS detektiert und anschließend per Datenbanksuche als EibG-Fragmente verifiziert werden konnten.

1-60 MSKKFTMTLL SSSLGGLLLG ISSGVLAQEL PPIK**DSGLPF** **YSVLKEADAS** HVTYGSTYRI
 61-120 **YYNKSSGWGT** **MRYVLNGKDE** **TLFNFDQEGN** **IIVLSKDNSI** **AYTVHEPVLK** **DFARMAAGLR**
 121-180 **TSDK**ENGKHQ VDEEEVR**RIE** **NKVNLSNTI** **INPEILKQSA** **FIASGPRPEG** **DRLVQASAAG**
 181-240 EFALAVGTGA RADKKFATSV GSWSAASGQQ SVALGGGTYA YADASTALGS VAFVDNTATY
 241-300 GTAVGNRAKV DKDATEGTAL GAKATVTNKN **SVALGANSRT** **TRDNEVYIGY** **EAEPGKAYKT**
 301-360 **RVLGGLSDGT** **RPSDAATVRQ** **VDRVKDSVEQ** **LAQDTNTRLV** **VEAKKSREYT** **DSRTTVGVNS**
 361-420 **DCTLTRAEGA** **SKTLAVNDGL** **VALSGRTDRI** **DAAVGSVDRR** **VTKNTQAIQS** **NTRQLQEHNA**
 421-480 **RLNSQQRQIR** ENHEEMKRAA AQSAALAGLF QPYSVGKFNA TAALGGYS DK QAIAVGVGYR
 481-508 FNEQTAAKAG IAASDGDVSY NMGVNFEF **52,2% Sequenzabdeckung**

Abbildung 36: Sequenzabdeckung von Trypsin-verdaulichem EibG. Aus einem gelelektrophoretisch getrennten Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* 3671/97 wurde die Coomassie Blau-gefärbte EibG-Bande im Gel tryptisch verdaut, chemisch modifiziert, extrahiert und über ZipTipC18-Chromatographie aufgereinigt. Für die Präparation wurde 1 µl des aufgereinigten Verdauansatzes mit 1 µl DHB gemischt und auskristallisiert. In Rot unterlegt sind die identifizierten Peptidfragmente des tryptischen Verdaus von EibG.

7.2 Neutrale GSL aus Endothelzellen

Nach der Strukturidentifizierung der Pathogenitätsfaktoren Stx1, Stx2, EHEC-hly, EspP, Cdt, SfpA und EibG aus EHEC mittels PMF und MALDI-TOF MS konnten nun Bindungs- und Interaktionsstudien durchgeführt werden. Um die Interaktionen von Stx1 und Stx2 mit ihren Rezeptor-GSL genauer zu charakterisieren, wurden zunächst die GSL aus HBMECs und EA.hy 926 Zellen, später aus FCS (vgl. **Kapitel 7.3**) und aus humanem Plasma (vgl. **Kapitel 7.4**) untersucht.

Um nGSL aus humanen Endothelzellen zu charakterisieren, wurden Interaktionsstudien mit intakten Zellen mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Mit GSL-Isolaten aus den Zellen fand zunächst anhand von DC-Overlay-Assays eine Identifizierung der Einzelkomponenten, insbesondere der Stx-Rezeptoren, statt und es erfolgte anschließend eine exakte Strukturaufklärung mittels ESI Q-TOF MS Analysen. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

7.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie von nGSL aus Endothelzellen

Zunächst wurde die GSL-Expression auf den Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dafür wurden zwei Endothelzelllinien, HBMEC und EA.hy 926, in Kulturkammern direkt auf Glasobjektträgern kultiviert und mit verschiedenen Anti-GSL-Antikörpern sowie Kombinationen aus Stx1 und Anti-Stx1-Antikörpern inkubiert. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte über einen DTAF konjugierten Sekundärantikörper, womit die Bindung des Primärantikörpers bzw. des Toxins an GSL gezeigt wird. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in **Abbildung 37** für HBMECs und in **Abbildung 38** für EA.hy 926 Zellen gezeigt.

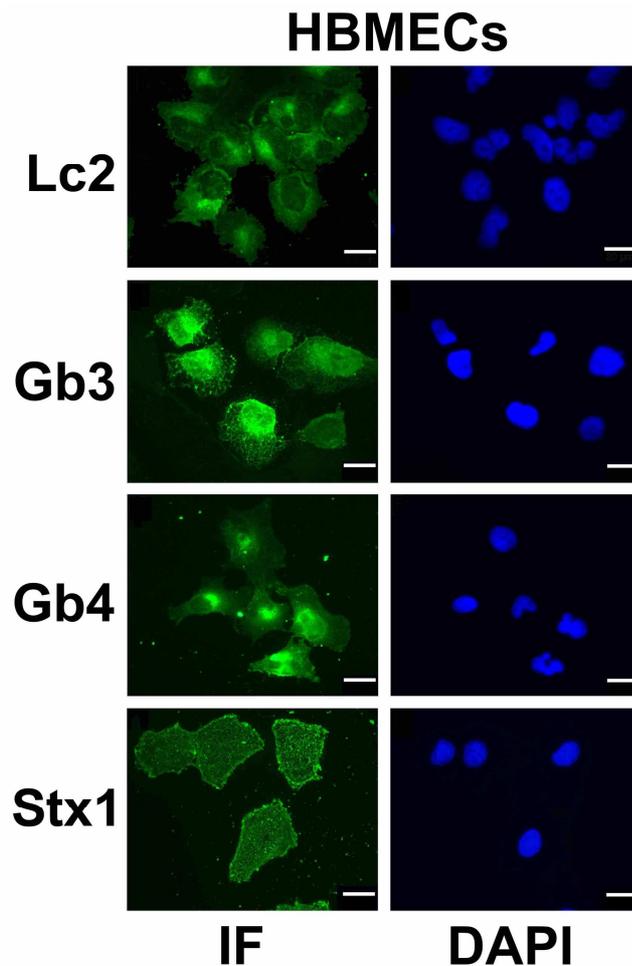


Abbildung 37: Immunfluoreszenzmikroskopie von nGSL in HBMECs. Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zum Nachweis von Lc2Cer und nGSL der Globoserie in HBMECs. Es wurden Anti-Lc2Cer-, Anti-Gb3Cer- und Anti-Gb4Cer-Antikörper verwendet sowie eine Kombination aus Stx1 und einem Anti-Stx1-Antikörper. Links ist die Immunfluoreszenzfärbung (IF) mittels DTAF-Konjugat zu erkennen, rechts die Zellkernfärbung mit einem Nukleinsäure färbenden DNA-Farbstoff (DAPI).

Die Immunfluoreszenzfärbung der nGSL der Globoserie sowie der Vorläuferstruktur Lc2Cer in HBMECs ergab für Lc2Cer (vgl. **Abbildung 37: Lc2**) eine schwache bis moderate Färbung und für Gb3Cer und Gb4Cer (vgl. **Abbildung 37: Gb3 und Gb4**) eine moderate bis starke Färbung. Die korrespondierende Färbung mit Stx1 und einem monoklonalen Anti-Stx1-Antikörper ergab ebenfalls eine moderate bis starke Färbung. Die Zellkernfärbung mit DAPI verdeutlicht, dass alle Zellen gefärbt wurden.

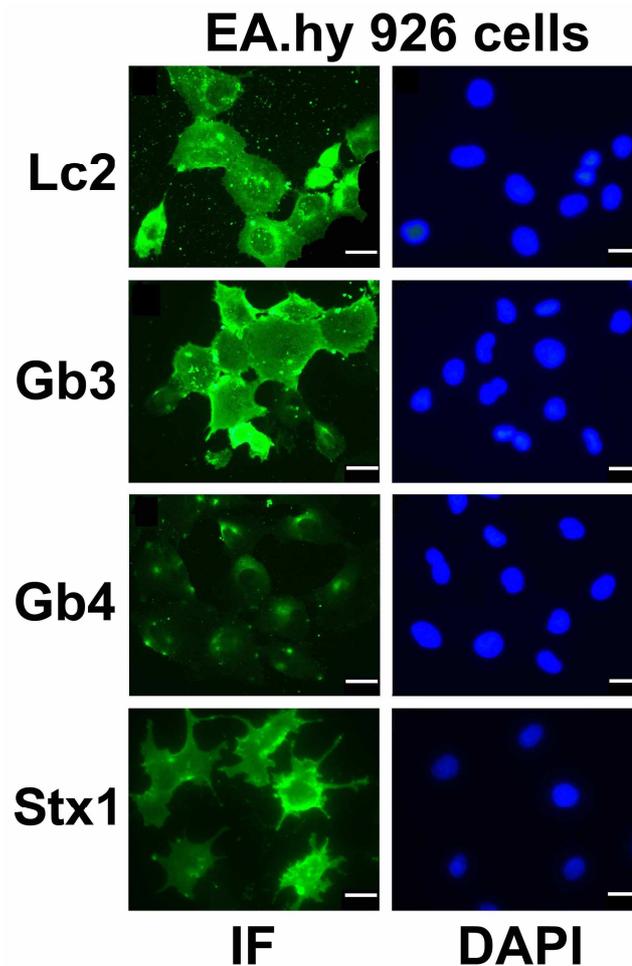


Abbildung 38: Immunfluoreszenzmikroskopie von nGSL in EA.hy 926 Zellen. Dargestellt sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zum Nachweis von Lc2Cer und nGSL der Globoserie in HBMECs. Es wurden Anti-Lc2Cer-, Anti-Gb3Cer- und Anti-Gb4Cer-Antikörper verwendet sowie eine Kombination aus dem Stx1 und einem Anti-Stx1-Antikörper. Links ist die Immunfluoreszenzfärbung (IF) mittels DTAF-Konjugat zu erkennen, rechts die Zellkontrollfärbung mit einem Nukleinsäure färbenden DNA-Farbstoff (DAPI).

EA.hy 926 Zellen wiesen für Lc2Cer und Gb3Cer eine starke (vgl. **Abbildung 38** Lc2 und Gb3), für Gb4Cer hingegen eine extrem schwache Färbung auf (vgl. **Abbildung 38** Gb4). Die korrespondierende Färbung mit Stx1 und einem monoklonalen Anti-Stx1-Antikörper zeigte analog zum Gb3Cer-Nachweis ebenfalls eine starke Färbung. Bei der DAPI Zellkernfärbung ist zu erkennen, dass beim Anti-Lc2Cer-Test alle Zellen homogen angefärbt wurden, in der Anti-Gb3Cer-Färbung hingegen einige Zellen eine sehr starke Färbung aufwiesen, andere jedoch sehr schwach leuchteten. Im Falle von Gb3Cer muss folglich von einer inhomogenen Verteilung gesprochen werden.

7.2.2 Polymerasekettenreaktion von Glykosyltransferasen aus humanen Endothelzellen

Um die in den Immunfluoreszenzfärbungen ersichtliche fehlende Expression von Gb4Cer in EA.hy 926 Zellen gegenüber den HBMECs zu erklären, wurde im Folgenden eine RT-PCR durchgeführt, um die Expression der für die Synthese der Globoserie-GSL verantwortlichen Glykosyltransferasen nachzuweisen. Dazu wurde mRNA aus beiden Zelllinien extrahiert, in cDNA transkribiert und schließlich mit spezifischen Primern amplifiziert. Die gegebenenfalls vorhandenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Ergebnis der RT-PCR zeigt **Abbildung 39**.

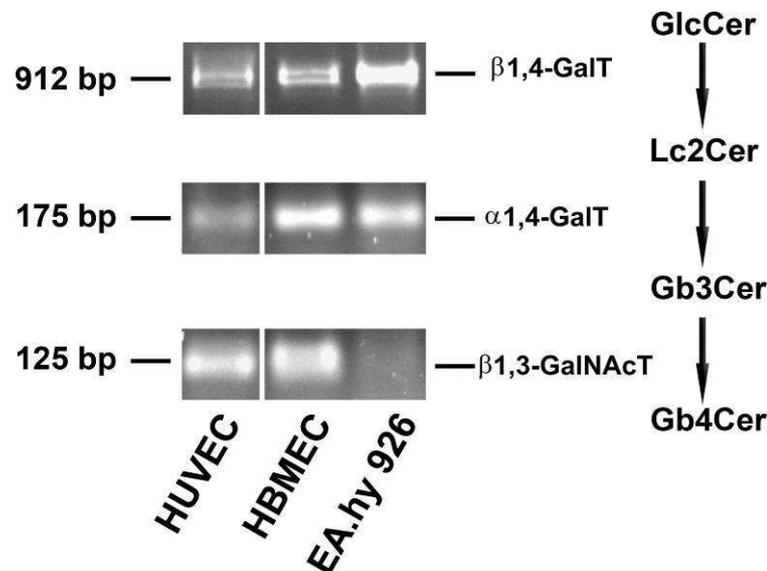


Abbildung 39: PCR von Glykosyltransferasen in HBMECs und EA.hy 926 Zellen. Die Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten erfolgte mit DNA aus HUVECs als Positivkontrolle. Zu erkennen sind die jeweiligen für die β1,4-Galaktosyltransferase (β1,4-GalT), α1,4-Galaktosyltransferase (α1,4-GalT) und β1,3-N-Acetyl-Galaktosaminyltransferase (β1,3-GalNAcT) spezifischen PCR-Amplifikate mit 912, 175 und 125 Basenpaaren (bp). Diese synthetisieren die GSL ausgehend vom Glukosylceramid (GlcCer) als Vorläuferstruktur, über das Laktosylceramid (Lc2Cer), bis zu den Globoserie-GSL Globotriaosylceramid (Gb3Cer) und Globotetraosylceramid (Gb4Cer).

Die PCR von Glykosyltransferasen, die für die Synthese der Globoserie-GSL verantwortlich sind, ergab im Falle der HBMECs ein positives Signal bei allen Transferasen bis hin zur β1,3-N-Acetyl-Galaktosaminyltransferase. Die EA.hy 926 Zellen hingegen besitzen ebenso wie die HBMECs die β1,4-Galaktosyltransferase zur

Synthese des Laktosylceramids und die α 1,4-Galaktosyltransferase zur Synthese von Gb3Cer, nicht jedoch die β 1,3-*N*-Acetyl-Galaktosaminyltransferase, um Gb4Cer zu synthetisieren. Hier lieferte die PCR ein negatives Ergebnis (vgl. **Abbildung 39**). Als Kontrolle dienten die bereits in mehreren Arbeiten untersuchten HUVECs (Gillard 1987, 1991, 1993, Müthing 1999), welche alle drei Transferasen exprimieren.

7.2.3 Dünnschichtchromatographie

Für einen Vergleich der GSL-Zusammensetzungen der HBMEC und EA.hy 926 Zellen wurden zusätzlich zur IF (vgl. **Kapitel 7.2.1**) dünnschichtchromatographische Trennungen durchgeführt und anschließend verschiedene Färbetechniken für deren Nachweis durchgeführt. Der Überblick über den Gesamtzellextrakt wurde mittels einer Gesamtzuckerfärbung der DC-getrennten GSL mit Orcin erstellt (vgl. **Abbildung 40 a**). Der exakte Vergleich der Einzelsubstanzen erfolgte durch Overlay-Assays mit Anti-GSL-Antikörpern bzw. Stx und Anti-Stx-Antikörpern (vgl. **Abbildung 40 b bis e**).

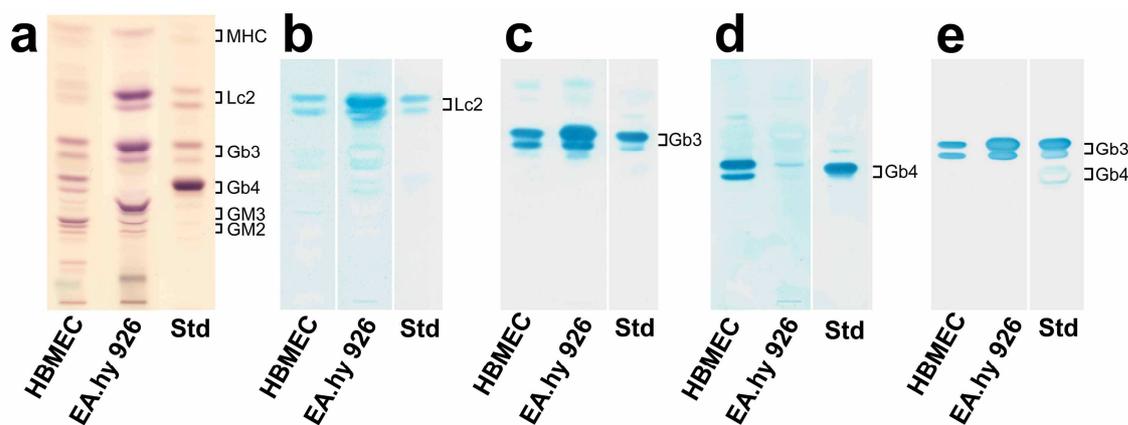


Abbildung 40: Dünnschichtchromatographie von nGSL aus HBMEC und EA.hy 926 Zellen. (a) Orcin-Färbung von GSL-Extrakten korrespondierend zu 2×10^6 Zellen aus HBMEC und EA.hy 926 Zellen. (b) Nachweis von Lc2Cer in HBMEC und EA.hy 926 (je $2 \cdot 10^6$ Zellen). (c) Gb3Cer in HBMEC und EA.hy 926 (je $5 \cdot 10^5$ Zellen) und (d) Gb4Cer in HBMEC und EA.hy 926 (je $5 \cdot 10^5$ Zellen). (e) Detektion von Stx-Rezeptoren in HBMEC und EA.hy 926 (je $5 \cdot 10^5$ Zellen). Die applizierten Referenzmischungen (Std) entsprechen $20 \mu\text{g}$ (a und e) sowie $5 \mu\text{g}$ (b-d) nGSL aus humanen Erythrozyten (JM10/80).

GSL weisen nach dünnschichtchromatographischer Trennung und anschließender Färbung ein typisches Doppelbandenmuster auf. Dieses wird durch den variablen Fettsäureanteil in den GSL hervorgerufen. Kurzkettige Fettsäuren enthaltende GSL sind polarer als solche mit langkettigen Fettsäuren, so dass sie stärker mit dem Kieselgel interagieren und dadurch retardiert werden.

Nach Färbung der Zucker mit Orcin (**Abbildung 40a**) ist zu erkennen, dass beide Zelllinien eine geringe Menge an Monohexosylceramid besitzen. Das Lc2Cer hingegen ist zwar in beiden Zelllinien vorhanden, in den EA.hy 926 Zellen jedoch im Vergleich zu den HBMECs wesentlich stärker exprimiert. Dieses bestätigt auch der Test mittels anti-Lc2Cer-AK (**Abbildung 40b**). Gb3Cer, der Haupt-Shiga Toxin-Rezeptor ist in beiden Zelllinien stark präsent. Auch dieses wird durch die Overlay-Assays bestätigt (**Abbildung 40 c und e**). Der Hauptunterschied der beiden Zelllinien wird allerdings durch den Test mit anti-Gb4Cer-AK ersichtlich (**Abbildung 40d**). Hier ist eine starke Expression in den HBMECs und lediglich eine extrem schwache Färbung bei den EA.hy 926 Zellen zu erkennen. Die prozentuale Verteilung der nGSL der Globoserie in den Endothelzellen liegt bei 9,8% MHC, 11,6% Lc2Cer, 42,1% Gb3Cer und 36,5% Gb4Cer für die HBMECs sowie 4,3% MHC, 45,9% Lc2Cer, 49,7% Gb3Cer und 0,1% Gb4Cer für die EA.hy 926 Zellen. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch mit den GSL nach Orcinfärbung.

7.2.4 Massenspektrometrie von nGSL aus Endothelzellen

Neben den immunchemischen Detektionsverfahren zur Rezeptorcharakterisierung wurden in dieser Arbeit massenspektrometrische Analysen durchgeführt, um die aus den Antikörper-Tests gewonnenen Ergebnisse über die GSL-Epitopstruktur mit genauen und exakten Strukturdaten zum Oligosaccharid- und Ceramidanteil der GSL-Moleküle zu unterstützen. Dazu wurden die immunchemisch gefärbten Banden des DC-Overlay-Assays aus dem Kieselgel abgekratzt, die GSL daraus extrahiert und für die Massenspektrometrie präpariert.

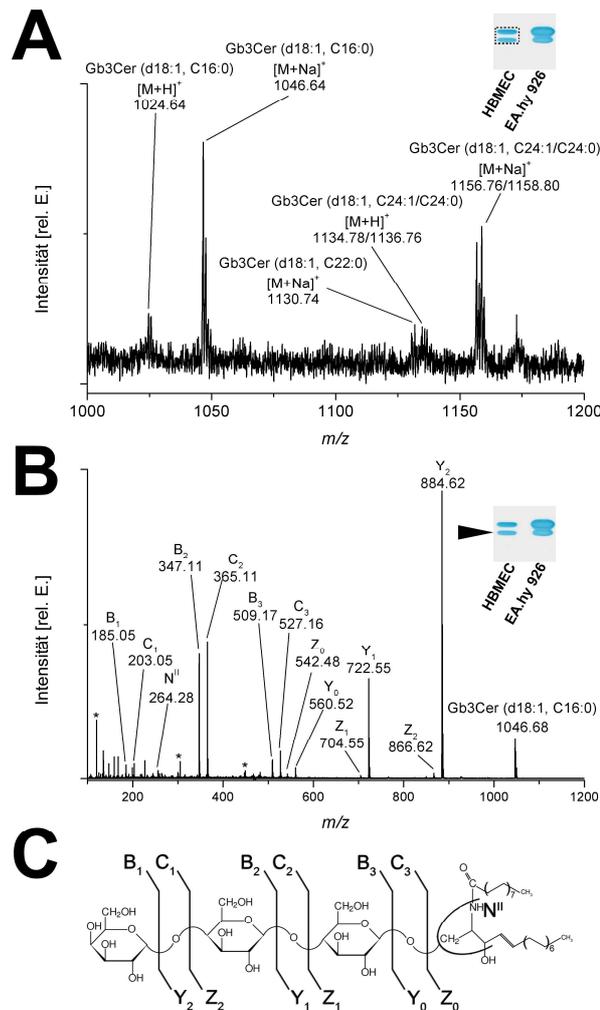


Abbildung 41: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus HBMECs. (A) MS1-Massenspektrum von Gb3Cer aus HBMECs. (B) Tandem-MS-Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,68. (C) Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C16:0). Per DC getrennte und immunchemisch gefärbte GSL korrespondierend zu $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden von der Platte abgekratzt, extrahiert, eingedampft und in 30 μ l MeOH resuspendiert. Für die Messung wurden 4 μ l des Ansatzes verwendet und mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH gemischt. Der gestrichelte Kasten deutet den extrahierten Bereich der DC-Platte an; der Pfeil weist auf die Gb3Cer-Spezies, die per Tandem-MS untersucht wurde. Interne Fragmentierungen und Ringspaltungen sind mit einem * markiert.

Die per DC getrennten und im Overlay-Assay mit Stx-1 detektierten Gb3Cer-Spezies aus HBMECs wurden durch Chloroformextraktion vom Plexigum befreit und mit einem Skalpell abgekratzt. Die GSL wurden anschließend mittels C/M/W (30:60:8, v/v/v) extrahiert, eingedampft und in 30 μ l MeOH resuspendiert. Für die MS-Messung kamen 4 μ l dieses Ansatzes gemischt mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH zum Einsatz.

Wie **Abbildung 41** zu entnehmen ist, konnten sowohl protonierte als auch mit Natrium kationisierte Molekülspezies der drei Hauptkomponenten Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1024,64 $[M+H]^+$ und 1046,64 $[M+Na]^+$, (d18:1, C24:1) bei m/z 1134,78 $[M+H]^+$ und 1156,76 $[M+Na]^+$ sowie (d18:1, C24:0) bei m/z 1136,76 $[M+H]^+$ und 1158,80

$[M+Na]^+$ mittels nanoESI Q-TOF MS detektiert werden. Die Molekülspezies mit der C22 Fettsäure wurde ausschließlich mit Natriumaddukten nachgewiesen (m/z 1030,74). Dabei lagen die längerkettige Fettsäuren-enthaltenden Moleküle (d18:1, C22:0/C24:1/C24:0) in etwa in äquimolarem Verhältnis zu den kurzkettigen Spezies (C16:0) vor (vgl. **Abbildung 41A**). Der Anteil der mit Natrium kationisierten Spezies war im gesamten Spektrum wesentlich höher als der der protonierten Molekülonen. Eine vollständige Liste der detektierten Molekülonen mit entsprechenden GSL-Strukturvorschlägen und den zugehörigen theoretischen m/z -Werten ist in **Tabelle 18** aufgelistet.

Tabelle 18: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Molekülonen von Stx1-detektierten Gb3Cer aus HBMECs und deren Strukturvorschläge.

m/z theoretisch	m/z experimentell	Ladungszustand	Strukturvorschlag
1024,68	1024,64	$[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1046,66	1046,64	$[M+Na]^+$	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1130,75	1130,74	$[M+Na]^+$	Gb3Cer (d18:1, C22:0)
1134,79	1134,78	$[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1136,80	1136,76	$[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:0)
1156,77	1156,76	$[M+Na]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1158,79	1158,80	$[M+Na]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:0)

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 40 ppm.

Für die Tandem-Massenspektrometrie (vgl. **Abbildung 41B**) wurde die Spezies mit der höchsten Signalintensität ausgewählt, und zwar Gb3Cer (d18:1, C16:0) $[M+Na]^+$. Sämtliche Fragmente der B- und C-Ionenserie vom Oligosaccharidpart sowie die kompletten Serien der das Ceramid enthaltenden Y- und Z-Serien konnten detektiert werden. Zusätzlich konnte bei m/z 264 das N^{II} -Ion nachgewiesen werden, welches ein charakteristisches Ion für das Sphingosin ist. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale entsprechen den durch interne Ringspaltungen entstandenen Fragmenten der A-Serie. Die Fragmente mit ihren dazugehörigen m/z -Werten sowie die Ergebnisse für die Tandem-MS von Gb3Cer (d18:1, C24:0) sind in **Tabelle 19** aufgelistet. Das Fragmentierungsschema zeigt **Abbildung 41 C** sowie die gesonderte Darstellung **Abbildung 42** im Anschluß an die Tabelle.

Tabelle 19: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Fragmentationen von Stx1-detektierten nGSL-Rezeptoren aus HBMECs und deren m/z -Werte.

Fragmentation	Gb3Cer	
	Mutterion	
	(d18:1, C16:0) m/z 1046.68	(d18:1, C24:0) m/z 1158.82
Fragmentation	m/z -Werte	m/z -Werte
$^{0,2}A_2$	305,09	305,08
$^{0,2}A_3$	467,17	467,15
B ₁ ; C ₁	185,05; 203,05	185,03; 203,04
B ₂ ; C ₂	347,11; 365,11	347,10; 365,11
B ₃ ; C ₃	509,17; 527,16	509,15; 527,17
Y ₀ ; Z ₀	560,52; 542,48	672,66; 654,65
Y ₁ ; Z ₁	722,55; 704,55	834,72; 816,70
Y ₂ ; Z ₂	884,62; 866,62	996,80; 978,79
N^{II}	264,28	264,25

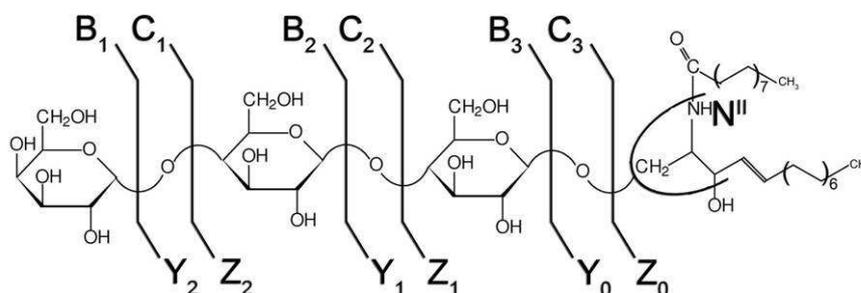


Abbildung 42: Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C16:0). Dargestellt sind die bei der Tandem-MS von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,68 identifizierten Spaltungen. Die internen Spaltungen und Ringbrüche der A-Serie (vgl. **Tabelle 19**) sind nicht ins Fragmentierungsschema aufgenommen.

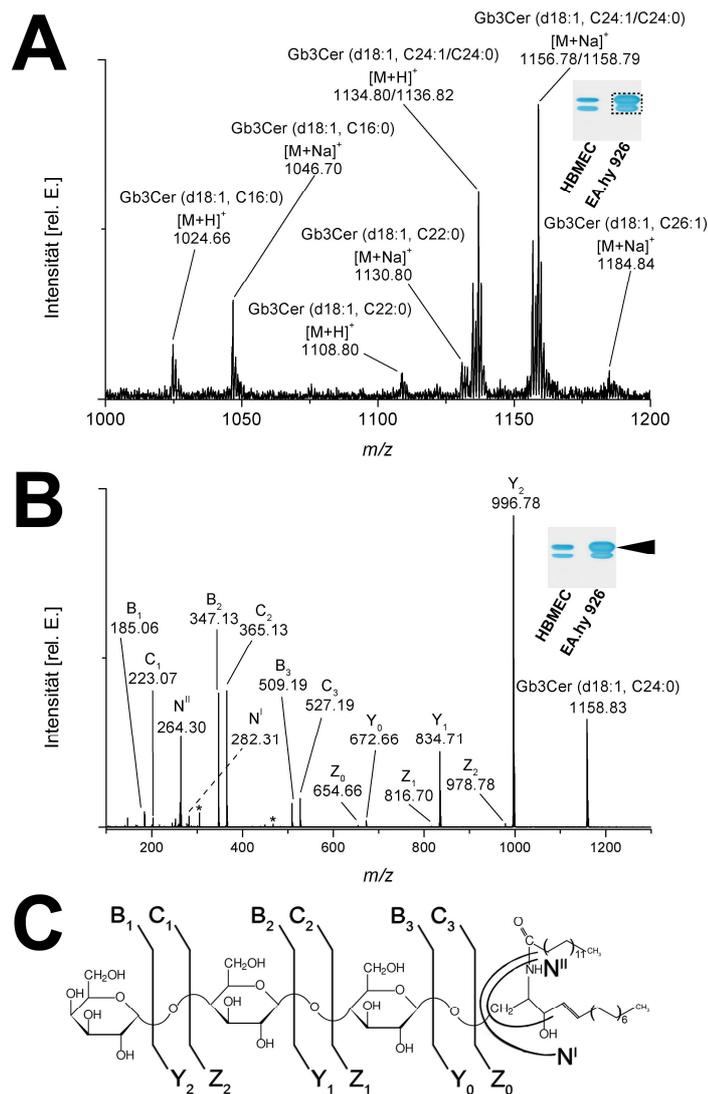


Abbildung 43: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus EA.hy 926 Zellen. (A) MS1-Massenspektrum von Gb3Cer aus HBMECs. (B) Tandem-MS-Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1158,83. (C) Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C24:0). Per DC getrennte und immunchemisch gefärbte GSL korrespondierend zu $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden von der Platte abgekratzt, extrahiert, eingedampft und in 30 μ l MeOH resuspendiert. Für die Messung wurden 4 μ l des Ansatzes verwendet und mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH gemischt. Der gestrichelte Kasten deutet den extrahierten Bereich der DC-Platte an, der Pfeil weist auf die Gb3Cer-Spezies, die per Tandem-MS untersucht wurde. Interne Fragmentierungen und Ringspaltungen sind mit einem * markiert.

Von den DC-Platten der Overlay-Assays mit Stx-1 detektierten Gb3Cer-Molekülen aus EA.hy 926 Zellen wurde durch mehrmaliges Tauchen in Chloroform das Plexigum entfernt. Die GSL wurden mit einem Skalpell abgekratzt, anschließend mittels C/M/W (30:60:8, v/v/v) extrahiert, eingedampft und in 30 μ l MeOH resuspendiert. Für die MS-Messung kamen 4 μ l dieses Ansatzes gemischt mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH zum Einsatz.

Wie in **Abbildung 43** dargestellt, konnten sowohl protonierte als auch mit Natrium kationisierte Molekülspezies der Hauptkomponenten Gb3Cer (d18:1, C16:0), bei m/z 1024,66 $[M+H]^+$ und 1046,70 $[M+Na]^+$, Gb3Cer (d18:1, C22:0), bei m/z 1108,80 $[M+H]^+$ und 1130,80 $[M+Na]^+$, Gb3Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1134,80 $[M+H]^+$ und 1156,78 $[M+Na]^+$ sowie Gb3Cer (d18:1, C24:0) bei m/z 1136,82 $[M+H]^+$ und 1158,79 $[M+Na]^+$ mittels nanoESI Q-TOF MS detektiert werden. Längerkettige Fettsäurenenthaltende Moleküle (d18:1, C22:0/C24:1/C24:0) sind dabei in deutlich größeren Mengen vorhanden als die kurzkettigen Varianten (d18:1, C16:0) (vgl. **Abbildung 43A**). Die mit Natrium kationisierten Molekülspezies wurden im Vergleich zu den protonierten mit leicht intensiveren Signalen detektiert. Eine vollständige Liste der detektierten Molekülonen mit entsprechenden GSL-Strukturvorschlägen kann **Tabelle 20** entnommen werden.

Tabelle 20: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Molekülonen von Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus EA.hy 926 Zellen und deren Strukturvorschläge.

$[M+Na]^+$ m/z theoretisch	$[M+Na]^+$, m/z Stx1-detektiert	Strukturvorschlag
1024,68 $[M+H]^+$	1024,66 $[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1046,66	1046,70	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1108,77	1108,80	Gb3Cer (d18:1, C22:1)
1130,75	1130,80	Gb3Cer (d18:1, C22:0)
1134,79 $[M+H]^+$	1134,80 $[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1136,80 $[M+H]^+$	1136,82 $[M+H]^+$	Gb3Cer (d18:1, C24:0)
1156,77	1156,78	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1158,79	1158,79	Gb3Cer (d18:1, C24:0)
1184,80	1184,84	Gb3Cer (d18:1, C26:1)

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei den durchgeführten Messungen bei unter 45 ppm.

Für die Tandem-Massenspektrometrie (vgl. **Abbildung 43 B**) wurde die Spezies mit der höchsten Signalintensität ausgewählt, und zwar Gb3Cer (d18:1, C24:0) $[M+Na]^+$. Sämtliche Fragmente der B- und C-Ionenserie vom Oligosaccharidpart sowie die kompletten Serien der das Ceramid enthaltenden Y- und Z-Ionenserien konnten detektiert werden. Zusätzlich konnten bei m/z von 264 das N^{II} -Ion und bei m/z 282 das N^I -Ion nachgewiesen werden, die beide charakteristische Ionen für das Sphingosin sind. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale entsprechen den durch interne Ringspaltungen entstandenen Fragmenten der A-Serie. Die vollständige Fragmentliste der m/z -Werte der detektierten Molekülionen sowie die Ergebnisse der Tandem-MS für Gb3Cer (d18:1, C16:0) und (d18:1, C24:0) sind der **Tabelle 21** zu entnehmen. Das Fragmentierungsschema ist in **Abbildung 43 C** sowie der gesonderten Darstellung (**Abbildung 44**) im Anschluß an die Tabelle gezeigt.

Tabelle 21: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Fragmentationen von Stx1/Anti-Stx1-detektierten nGSL-Rezeptoren aus EA.hy 926 Zellen und deren m/z -Werte.

	Gb3Cer	
	(d18:1, C16:0)	(d18:1, C24:0)
Mutterion	m/z 1046.67	m/z 1156.83
Fragmention	m/z -Werte	m/z -Werte
$^{0,2}A_2$	305,09	305,11
$^{0,2}A_3$	467,17	467,20
B ₁ ; C ₁	185,06; 203,07	185,06; 203,07
B ₂ ; C ₂	347,11; 365,11	347,13; 365,13
B ₃ ; C ₃	509,16; 527,15	509,19; 527,19
Y ₀ ; Z ₀	560,51; 542,50	672,66; 654,66
Y ₁ ; Z ₁	722,57; 704,57	834,71; 816,70
Y ₂ ; Z ₂	884,61; 866,61	996,78; 978,78
N^{II}	264,29	264,30

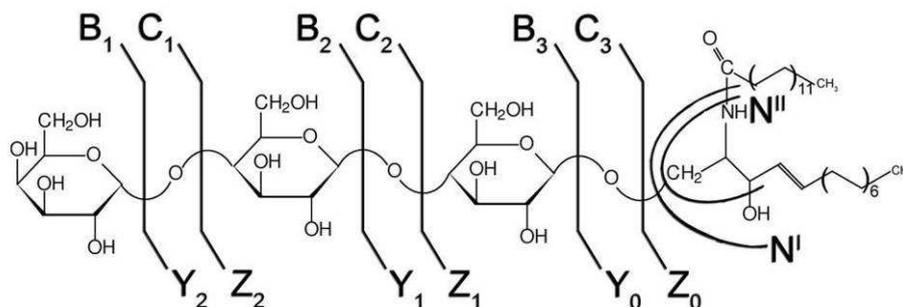


Abbildung 44 Fragmentierungsschema von Gb3Cer aus EA.hy 926 Zellen. Dargestellt sind die identifizierten Fragmentationen der Tandem-MS von Gb3Cer (d18:1, C24:0) mit m/z 1158,83. Die internen Spaltungen und Ringbrüche der A-Serie (vgl. **Tabelle 19**) sind nicht ins Fragmentierungsschema aufgenommen.

7.3 Neutrale GSL aus FCS

Da fötales Kälberserum (FCS) als Bestandteil der meisten Zellkulturmedien verwendet wird und bekannt ist, dass Zellen auch GSL aus ihrer Umgebung aufnehmen können, wurde in dieser Arbeit untersucht, wie die genaue Zusammensetzung der GSL im FCS ist und insbesondere, ob dort Stx-Rezeptoren zu finden sind.

Das FCS ist nach den Endothelzellen (vgl. **Kapitel 7.2**) das zweite Untersuchungsfeld für Stx-Rezeptoren und deren Interaktion mit Stx1 und Stx2. Als drittes wird im nachfolgenden Kapitel humanes Plasma getestet (vgl. **Kapitel 7.4**).

Um die genaue GSL-Zusammensetzung des FCS zu analysieren, wurden isolierte GSL mittels DC und Overlay-Assay getrennt und angefärbt und schließlich zur exakten Strukturanalyse mittels ESI Q-TOF MS charakterisiert.

7.3.1 Dünnschichtchromatographie von nGSL aus FCS

Um zunächst einen Überblick über die GSL-Zusammensetzung in fötalem Kälberserum zu erlangen, wurden dünnschichtchromatographische Trennungen und anschließende Overlay-Assays mit verschiedenen Anti-GSL-Antikörpern und Stx1/Anti-Stx1-Antikörpern durchgeführt. Die Übersichtsfärbung mit Orcin diente zur Gesamt-GSL-Bestimmung.

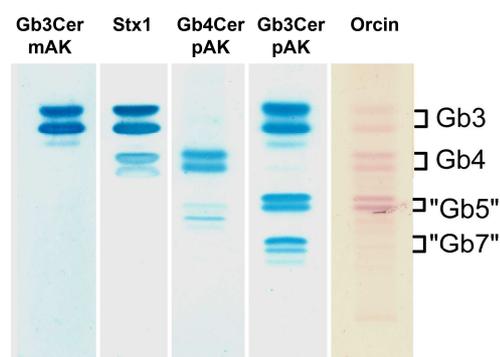


Abbildung 45: Dünnschichtchromatographische Trennung und Nachweis von Shiga Toxin-Rezeptoren in FCS. Overlay-Assays von nGSL aus FCS mit monoklonalem Anti-Gb3Cer- (**mAK**), polyklonalem Anti-Gb3Cer- (**pAK**) und polyklonalem Anti-Gb4Cer-Antikörper (**pAK**) sowie mit Stx1 und Anti-Stx1-Antikörper (**Stx1**). Die aufgetragenen Mengen (je 10 µl JM10/23) entsprechend 1,25 ml FCS. Die Kontrollfärbung stellt eine Gesamt-GSL-Färbung mit Orcin dar. Sie entspricht ebenfalls GSL korrespondierend zu 1,25 ml FCS.

Abbildung 45 zeigt die Overlay-Assays von chromatographisch aufgetrennten nGSL-Isolaten aus FCS. Zu erkennen ist, dass vorherrschend GSL der Globoserie im Serum enthalten sind (vgl. Orcin-Färbung der **Abbildung 45**). Die immunchemischen Färbungen mit den polyklonalen Anti-Gb3Cer- und Anti-Gb4Cer-Antikörpern sowie dem monoklonalen Anti-Gb3Cer-AK und Stx1/Anti-Stx1 ergaben, dass beide Shiga Toxin-Rezeptoren in einem etwa äquimolaren Verhältnis im FCS nachgewiesen werden konnten. Der polyklonale Anti-Gb3Cer-AK erkennt neben Gb3Cer noch weitere längerkettige GSL der Globoserie, mutmaßlich Gb5Cer und Gb7Cer, wohingegen der Anti-Gb3Cer-mAK ausschließlich Gb3Cer anfärbt. Auch Stx1 zeigte keinerlei Bindung zu den längerkettigen Strukturen, sondern ausschließlich zu den Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer.

7.3.2 Massenspektrometrie von nGSL aus FCS

Zusätzlich zu den immunchemischen Detektionsverfahren wurden zur Rezeptorcharakterisierung massenspektrometrische Analysen durchgeführt, um die aus den AK-Tests gewonnenen Strukturhinweise mit genauen und exakten Strukturinformationen über die GSL-Moleküle zu untermauern. Dazu wurden die DC-Platten zunächst durch Tauchen in Chloroform vom Plexigum befreit, die immunchemisch gefärbten Banden des DC-Overlay-Assays anschließend abgekratzt und die GSL daraus extrahiert. Nach Eindampfen und Wiederaufnahme in 50 μ l MeOH konnten die Proben für die MS-Analytik verwendet werden. Dazu wurden 2 μ l eines Probenansatzes mit 7 μ l MeOH verdünnt und 1 μ l HCOOH hinzugegeben und für die nanoESI Q-TOF MS verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in **Abbildung 46** gezeigt.

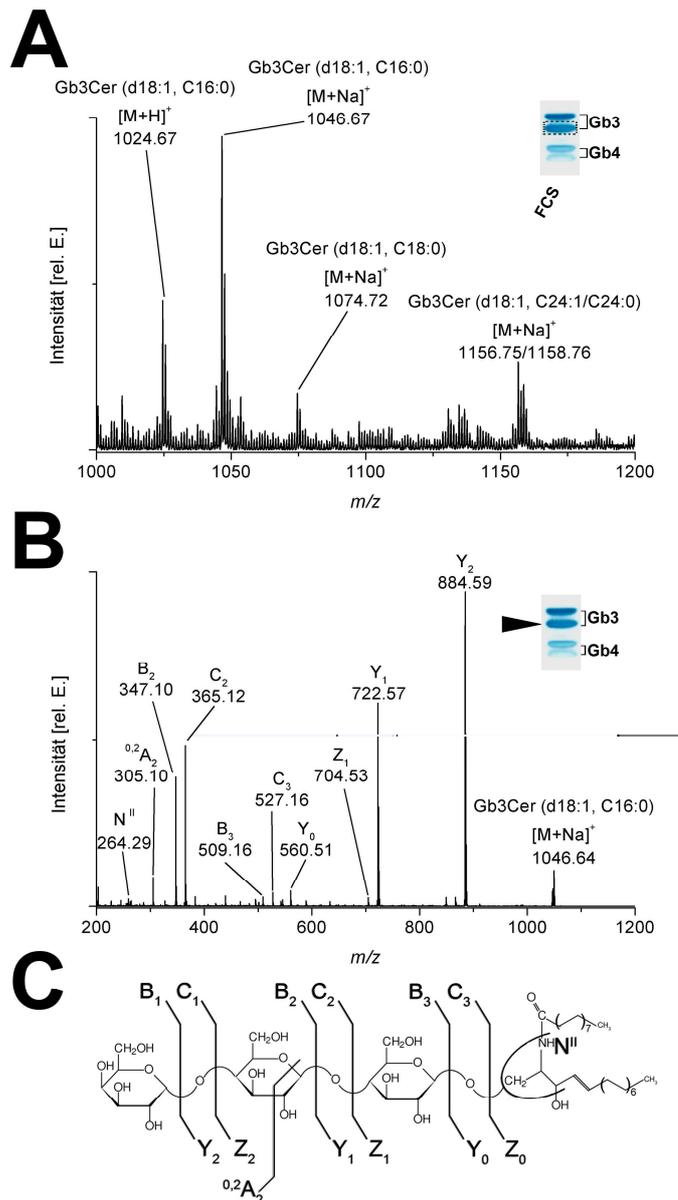


Abbildung 46: nanoESI-Q-TOF Massenspektren von Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus FCS. (A) MS1-Massenspektrum der Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Banden aus FCS. 9 x 10 μ l JM10/23 entsprechend 1,25 ml FCS wurden für die DC eingesetzt, die GSL aus dem Kieselgel extrahiert, in 50 μ l MeOH wieder aufgenommen und 2 μ l davon mit 7 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH für die MS verwendet. (B) Tandem-MS-Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,64. (C) Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C16:0).

Die obere Stx1/Anti-Stx1-detektierte Doppelbande entspricht den im FCS enthaltenen Gb3Cer -Spezies (Abbildung 46 A). Detektiert wurden im MS1-Modus protonierte Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1024,67 und die mit Natrium kationisierten Spezies Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67, Gb3Cer (d18:1, C18:0) bei m/z 1074,72 und Gb3Cer (d18:1, C24:1, C24:0) bei m/z 1156,75/1158, 76. Das Hauptsignal stammte von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67. Eine Auflistung aller detektierten Molekülonen erfolgt in Tabelle 22.

In **Tabelle 22** sind neben den Strukturdaten der Stx1-detektierten Gb3Cer- und Gb4Cer-Spezies zudem die Ergebnisse der MS-Analysen von AntiGb3Cer-pAK- und Anti-Gb4Cer-pAK-detektierten GSL dargestellt. Dies zeigt deutlich die Unterschiede in den Bindungsverhalten von AK und Stx1. Die mit dem polyklonalen anti-Gb3Cer-AK detektierten Spezies sind blau unterlegt, grün die mit dem polyklonalen anti-Gb4Cer-AK identifizierten und rot die mit Stx1 nachgewiesenen Strukturen.

Tabelle 22: Mittels nanoESI Q-TOF MS detektierte Molekülonen von nGSL aus FCS mit den zugehörigen Strukturvorschlägen.

m/z , [M+Na] ⁺ theoretisch	m/z , [M+Na] ⁺ Anti-Gb3Cer/Gb4Cer- pAK-detektiert	m/z , [M+Na] ⁺ Stx1-detektiert ²	Strukturvorschlag
1024,68 [M+H] ⁺	1024,66 [M+H] ⁺	1024,66 [M+H] ⁺	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1046,66	1046,66	1046,66	Gb3Cer (d18:1, C16:0)
1074,69	n.d. ¹	1074,70	Gb3Cer (d18:1, C18:0)
1130,75	1130,72	n.d. ¹	Gb3Cer (d18:1, C22:0)
1134,79 [M+H] ⁺	1134,76 [M+H] ⁺	n.d. ¹	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1136,80 [M+H] ⁺	1136,78 [M+H] ⁺	n.d. ¹	Gb3Cer (d18:1, C24:0)
1156,77	1156,74	1156,74	Gb3Cer (d18:1, C24:1)
1158,79	1158,78	1158,78	Gb3Cer (d18:1, C24:0)
1227,76 [M+H] ⁺	n.d. ¹	1227,73 [M+H] ⁺	Gb4Cer (d18:1, C16:0)
1249,74	1249,73	1249,72	Gb4Cer (d18:1, C16:0)
1277,77	1277,75	1277,74	Gb4Cer (d18:1, C18:0)
1333,83	1333,82	1333,76	Gb4Cer (d18:1, C22:0)
1337,87 [M+H] ⁺	1337,86 [M+H] ⁺	n.d. ¹	Gb4Cer (d18:1, C24:1)
1359,85	1359,85	1359,79	Gb4Cer (d18:1, C24:1)
1361,86	1361,81	1361,83	Gb4Cer (d18:1, C24:0)
1409,78	1409,80	---	Gb5Cer (d18:1, C16:1)
1411,79	1411,88	---	Gb5Cer (d18:1, C16:0)
1439,82	1439,91	---	Gb5Cer (d18:1, C18:0)
1521,90	1521,85	---	Gb5Cer (d18:1, C24:1)
1523,92	1523,96	---	Gb5Cer (d18:1, C24:0)
1748,89	1748,78	---	Gb7Cer (d18:1, C14:0)
1774,91	1774,88	---	Gb7Cer (d18:1, C16:1)
1776,92	1776,89	---	Gb7Cer (d18:1, C16:0)
1790,88	1790,89	---	Gb7Cer (d18:1, h16:1)
1792,90	1792,91	---	Gb7Cer (d18:1, h16:0)
1804,96	1804,95	---	Gb7Cer (d18:1, C18:0)
1861,02	1861,02	---	Gb7Cer (d18:1, C22:0)
1875,03	1875,09	---	Gb7Cer (d18:1, C23:0)
1887,03	1887,08	---	Gb7Cer (d18:1, C24:1)
1889,05	1889,08	---	Gb7Cer (d18:1, C24:0)

¹n.d.: nicht detektiert

²Stx1 zeigte keine Bindung an die langkettigen nGSL Gb5Cer und Gb7Cer; deshalb konnten diese Strukturen nicht über die Stx1-Detektion nachgewiesen werden (---).

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei allen Messungen von Gb3Cer unter 30 ppm, bei Gb4Cer unter 53 ppm, bei Gb5Cer unter 64 ppm und bei Gb7Cer unter 63 ppm.

Das Hauptsignal des Spektrums, das Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67 entsprach, wurde für die Tandem-Massenspektrometrie ausgewählt (vgl. **Abbildung 46 B**). Sämtliche Ionen der B- und C-Serie vom Oligosaccharidpart (Anmerkung: B₁ und C₁ sind nicht im Spektrum dargestellt) und die vollständigen Serien der Y- und Z-Reihe vom Ceramidteil konnten nachgewiesen werden (Anmerkung: Z₀ und Z₂ sind als Ionen von geringer Intensität nicht im Spektrum markiert). Zudem wurde mit dem ^{0,2}A₂-Ion bei m/z 305,11 eine Ringspaltung detektiert und mit dem N^{II}-Ion ein charakteristisches Fragment für das d18:1 Sphingosin nachgewiesen. Das Fragmentierungsschema des Moleküls ist in **Abbildung 46 C** gezeigt, die Liste aller detektierten GSL-Strukturen mit ihren zugehörigen m/z -Werten sind in **Tabelle 23** aufgeführt.

Tabelle 23: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Fragmentionen von Stx1-detektierten nGSL-Rezeptoren aus FCS und die zugehörigen m/z -Werte.

Vorläuferion	Gb3Cer		Gb4Cer	
	(d18:1, C16:0)	(d18:1, C24:0)	(d18:1, C16:0)	(d18:1, C24:1)
	m/z 1046,64	m/z 1158,79	m/z 1249,73	m/z 1359,87
Fragmention	m/z -Werte	m/z -Werte	m/z -Werte	m/z -Werte
^{0,2} A ₂	305,10	305,10	n.d. ¹	n.d. ¹
^{0,2} A ₃	467,15	467,17	n.d. ¹	n.d. ¹
B ₁ ; C ₁	185,06; 203,07	185,06; 203,07	226,10; n,d,	226,10; n,d. ¹
B ₂ ; C ₂	347,10; 365,12	347,12; 365,12	388,15; 406,15	388,15; 406,15
B ₃ ; C ₃	509,16; 527,16	509,16; 527,18	550,20; 568,20	550,20; 568,22
B ₄ ; C ₄	-----	-----	712,23; 730,27	712,27; 730,27
Y ₀ ; Z ₀	560,51; 542,50	672,64; 654,64	560,54; 542,51	672,64; 652,61
Y ₁ ; Z ₁	722,57; 704,53	834,69; 816,67	722,60; 704,56	834,72; 816,70
Y ₂ ; Z ₂	884,59; 866,59	996,74; 978,74	884,62; 866,63	996,78; 978,78
Y ₃ ; Z ₃	-----	-----	1046,67; 1028,64	1158,83; n.d. ¹
N ^{II}	264,29	264,29	264,31	264,31

¹n.d.: nicht detektiert

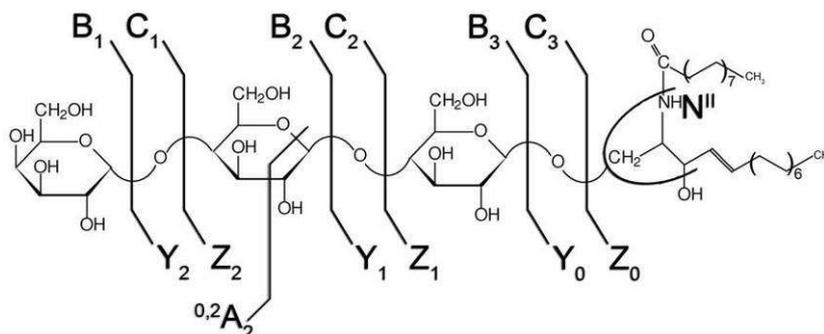


Abbildung 47: Fragmentierungsschema von Gb3Cer aus FCS. Dargestellt sind die bei der Tandem-MS von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,64 identifizierten Fragmente. Die internen Spaltungen und Ringbrüche der A-Serie, mit Ausnahme von ^{0,2}A₂, (vgl. **Tabelle 23**) sind nicht ins Fragmentierungsschema aufgenommen.

7.4 Neutrale GSL aus humanem Plasma

Zum Abschluß dieser Arbeit wurde humanes Plasma untersucht, um die Frage zu klären, ob sich in humanem Plasma Stx-Rezeptoren nachweisen lassen. Dazu wurden nGSL-Isolate aus humanem Plasma mittels DC getrennt und über Overlay-Assays auf ihren GSL-Gehalt überprüft. Eine detaillierte Strukturaufklärung erfolgte durch die anschließende ESI Q-TOF MS der immunpositiv-gefärbten Banden aus den Overlay-Assays. Desweiteren sollte über DC-Overlay-Assays mit Lipoproteinfraktionen geklärt werden, mit welchen Lipoproteinen die Stx1- und Stx2-Rezeptoren assoziiert sind.

7.4.1 Dünnschichtchromatographie von nGSL aus humanem Plasma

Für den Überblick über die GSL-Zusammensetzung in humanem Plasma wurde zunächst eine dünnschichtchromatographische Trennung mit anschließenden Overlay-Assays mit verschiedenen Anti-GSL-AK und Stx1/Anti-Stx1- bzw. Stx2/Anti-Stx2-AK durchgeführt. Die Übersichtsfärbung mit Orcin diente der Erfassung der Gesamt-GSL.

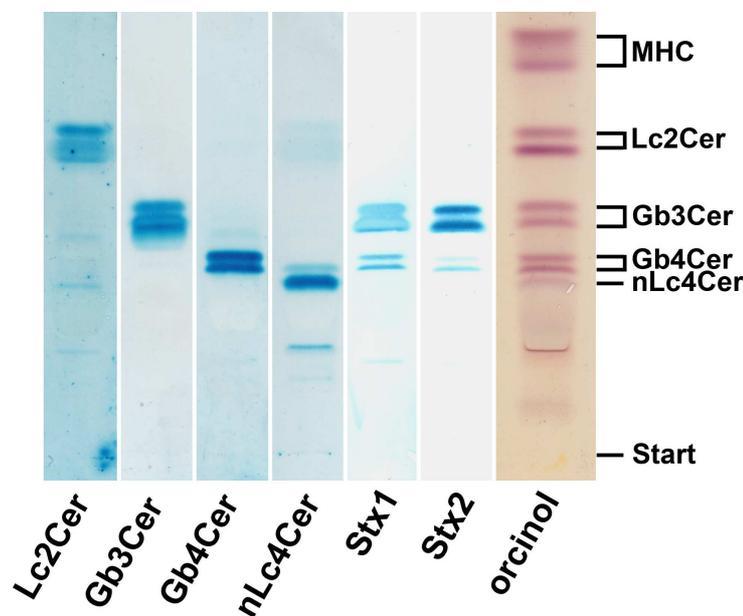


Abbildung 48: Dünnschichtchromatographische Trennung und Identifizierung von nGSL in humanem Plasma. Overlay-Assay von nGSL aus humanem Plasma mit verschiedenen Anti-nGSL-Antikörpern, sowie mit Stx1/Anti-Stx1-Antikörpern als auch Stx2/Anti-Stx2-Antikörpern. Aufgetragen wurden je 15 µl der aufgereinigten nGSL-Fraktion aus Humanplasma JM09/249 korrespondierend zu je 750 µl humanem Plasma. Zur Gesamtzuckerfärbung mittels Orcin wurden ebenfalls 15 µl JM09/249 entsprechend 750 µl humanem Plasma appliziert.

MHC, Lc2Cer und die GSL der Globoserie Gb3Cer und Gb4Cer konnten in humanem Plasma sowohl per Immundetektion (vgl. **Abbildung 48 Lc2Cer – Stx2**) als auch mittels Orcinfärbung (vgl. **Abbildung 48 orcinol**) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte nLc4Cer aus der Neolakto-Serie detektiert werden. Zum Nachweis von Monohexosylceramiden (MHC) stand kein Antikörper zur Verfügung, so dass deren Detektion über die Gesamt-GSL-Färbung mit Orcin bzw. die Lipidfärbung mit Primulin erfolgte. Die über die Orcinfärbung ermittelte quantitative GSL-Zusammensetzung des Plasmas entspricht 31,3% MHC, 29,7% Lc2Cer, 18,1% Gb3Cer, 16,2% Gb4Cer und 4,2% nLc4Cer. Da die Monohexosylceramide offensichtlich die Hauptkomponenten der nGSL aus Plasma repräsentieren, wurde im Folgenden neben der massenspektrometrischen Analyse der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer aus Plasma eine strukturelle Charakterisierung der MHC durchgeführt.

7.4.2 Massenspektrometrie von nGSL aus humanem Plasma

Zu den immunochemischen Detektionsverfahren wurden zur GSL-Charakterisierung zusätzlich massenspektrometrische Analysen durchgeführt, um die aus den Antikörpertests gewonnenen Strukturhinweise mit exakten Strukturinformationen zu untermauern. Zur Analytik der Stx-Rezeptoren wurden die DC-Platten zunächst durch Tauchen in Chloroform vom Plexigum befreit, die immunochemisch im DC-Overlay-Assay gefärbten GSL-Doppelbanden separat aus dem Kieselgel abgekratzt und die GSL daraus extrahiert. Die GSL wurden somit getrennt auf ihre kurzkettigen und langkettigen Strukturen hin untersucht. Nach Eindampfen und Wiederaufnahme in 50 μ l MeOH konnten die Proben für die MS-Analytik verwendet werden. Dazu wurden 4 μ l eines Probenansatzes mit 4 μ l MeOH verdünnt und 1 μ l HCOOH hinzugegeben und für die nanoESI Q-TOF MS verwendet.

Um die Hauptkomponenten des humanen Plasmas, die MHC, zu charakterisieren, mussten in Ermangelung von Antikörpern gegen MHC die mit Primulin gefärbten Banden von der DC-Platte extrahiert werden. Diese konnten anschließend ohne weitere Aufreinigung mittels MS vermessen werden.

Kurzkettige Gb3Cer-Spezies

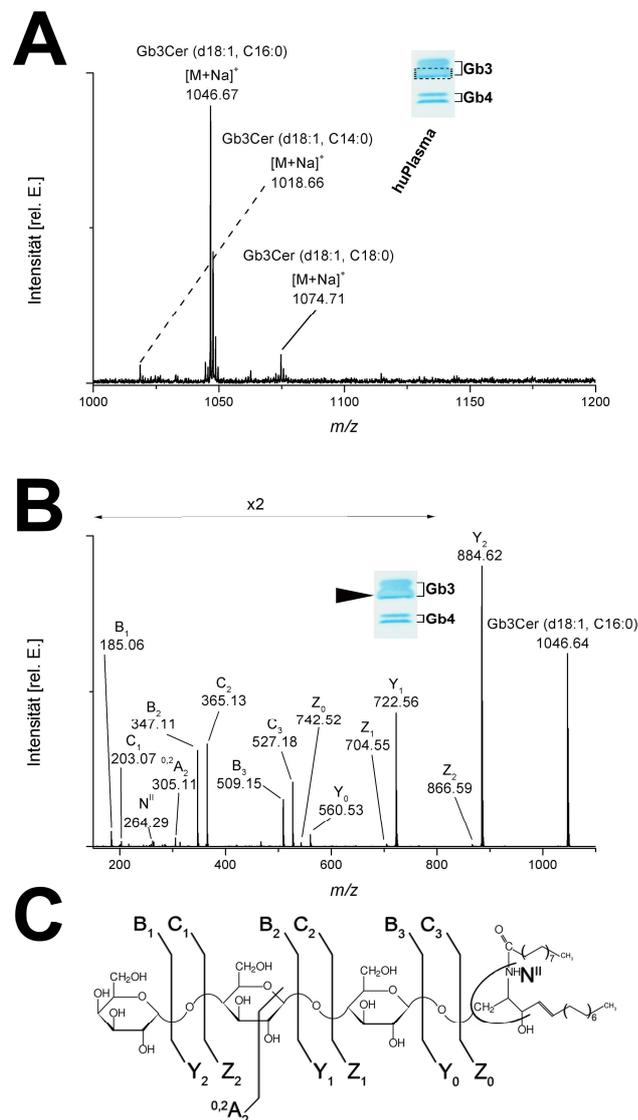


Abbildung 49: nanoESI-Q-TOF Massenspektren der unteren Stx1/Anti-Stx1-positiven Gb3Cer-Bande aus humanem Plasma. (A) MS1-Massenspektrum der Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus humanem Plasma in der unteren Bande. 15 μ l korrespondierend zu 750 μ l Plasma wurden für die DC eingesetzt, die GSL aus dem Kieselgel extrahiert, eingengt und in 30 μ l MeOH wieder aufgenommen. Vier μ l davon wurden zusammen mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH für die MS verwendet. (B) Fragmentationenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,64. (C) Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C16:0).

Wie in **Abbildung 49 A** zu erkennen ist, enthält die untere Stx1/Anti-Stx1-positive Gb3Cer-Bande die Gb3Cer-Spezies mit kurzkettigen Fettsäuren. Detektiert wurden Gb3Cer (d18:1, C14:0) bei m/z 1018,66, Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1018,67 und Gb3Cer (d18:1, C18:0) bei m/z 1074,71. Das Hauptsignal stammte vom Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67. Eine Auflistung aller detektierten Molekülonen erfolgt in

Tabelle 24. Zusätzlich enthält die Tabelle die Strukturdaten von weiteren AK- und Stx2-detektierten GSL, die ebenfalls mittels ESI Q-TOF MS vermessen wurden.

Die Molekülionen mit der höchsten Signalintensität, und zwar Gb3Cer (d18:1, C16:0) bei m/z 1046,67, wurden für die Tandem-Massenspektrometrie ausgewählt (vgl. **Abbildung 49 B**). Sämtliche Ionen der B- und C-Serie vom Oligosaccharidpart und die vollständigen Serien der Y- und Z-Reihe vom Ceramidteil konnten nachgewiesen werden. Zudem wurde mit dem $^{0,2}A_2$ -Ion bei m/z 305,11 eine Ringspaltung und mit dem N^{II} -Ion ein charakteristisches Ion für d18:1 Sphingosin detektiert. Die Fragmentierung des Moleküls und die Zuordnung der Fragmentionen ist in **Abbildung 49 C** dargestellt. Die detektierten Fragmente mit ihren m/z -Werten sind in **Tabelle 25** aufgelistet.

Langkettige Gb3Cer-Spezies

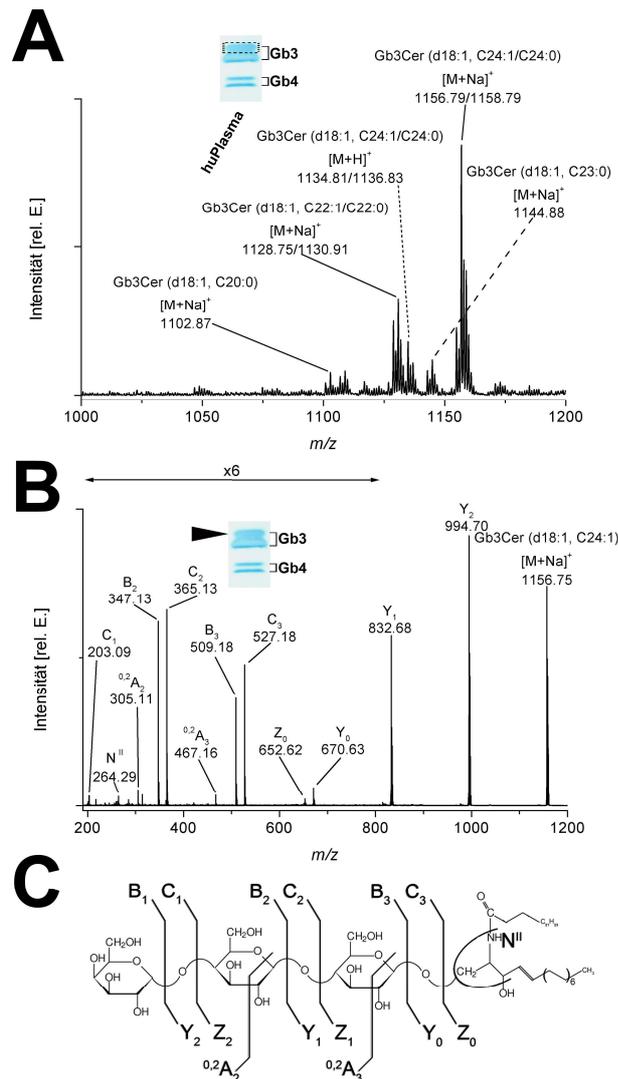


Abbildung 50: nanoESI-Q-TOF Massenspektren der oberen Stx1/Anti-Stx1-positiven Gb3Cer-Bande aus humanem Plasma. (A) MS1-Massenspektrum der oberen Stx1/Anti-Stx1-detektierten Gb3Cer-Spezies aus humanem Plasma. 15 μ l korrespondierend zu 750 μ l Plasma wurden für die DC eingesetzt, die GSL aus dem Kieselgel extrahiert und in 30 μ l MeOH wieder aufgenommen. Von diesem Ansatz wurden 4 μ l zusammen mit 4 μ l MeOH und 1 μ l HCOOH für die MS verwendet. (B) Tandem-MS-Massenspektrum von Gb3Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1156,64. (C) Fragmentierungsschema von Gb3Cer (d18:1, C24:1).

In der oberen Stx1/Anti-Stx1-positiven Gb3Cer Bande wurden langkettige Fettsäurenenthaltende Gb3Cer-Spezies nachgewiesen (Abbildung 50 A). Detektiert wurden im MS1-Spektrum Gb3Cer (d18:1, C20:0) bei m/z 1102,87, Gb3Cer (d18:1, C22:1/C22:0) bei m/z 1128,75/1130,91, Gb3Cer (d18:1, C23:0) bei m/z 1144,88 und Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) bei m/z 1156,79/1158,79 als mit Natrium kationisierte Spezies. Zusätzlich wurden Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) bei m/z 1134,81/1136,83 als protonierte Spezies gefunden. Das Hauptsignal stammte von Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) bei m/z

1156,79/1158,79. Sämtliche detektierte Molekülonen sind in **Tabelle 24** aufgelistet. Die Tabelle enthält zudem Daten aus weiteren MS-Analysen mit Anti-Lc2Cer-AK-, Anti-Gb3Cer-AK-, Anti-Gb4Cer-AK-, Anti-nLc4Cer-AK- sowie Stx2-detektierten GSL (vgl. auch **Abbildung 48**).

Tabelle 24: Mittels nanoESI Q-TOF MS detektierte Molekülonen von nGSL aus humanem Plasma und deren Strukturvorschläge.

m/z , $^1[M+Na]^+$ theoretisch	$^1[M+Na]^+$, m/z		m/z , $[M+Na]^+$ Stx1-detektiert	m/z , $[M+Na]^+$ Stx2-detektiert	Strukturvorschlag
	Anti-Lc2Cer-AK- Anti-Gb3Cer-AK- Anti-Gb4Cer-AK- Anti-nLc4Cer-AK- detektiert	m/z , $[M+Na]^+$ detektiert			
856,57	856,58	² n.d.	n.d.	n.d.	Lc2Cer (d18:1, C14:0)
884,61	884,59	n.d.	n.d.	n.d.	Lc2Cer (d18:1, C16:0)
994,72	994,68	n.d.	n.d.	n.d.	Lc2Cer (d18:1, C24:0)
1046,66	1046,67	1046,67	1046,63		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C16:0)
1074,69	1074,68	1074,71	1074,64		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C18:0)
1128,74	1128,74	1128,75	1128,68		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C22:1)
1130,75	1130,76	1130,77	1130,70		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C22:0)
1144,77	1144,77	1144,78	1144,75		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C23:0)
1156,77	1156,78	1156,79	1156,76		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C24:1)
1158,79	1158,78	1158,79	1158,77		Gb3Cer/CD77 (d18:1, C24:0)
1249,74	1249,73	1249,73	1249,69		Gb4Cer (d18:1, C16:0)
1277,77	1277,71	1277,80	1277,67		Gb4Cer (d18:1, C18:0)
1331,82	1331,80	1331,84	1331,94		Gb4Cer (d18:1, C22:1)
1333,83	1333,86	1333,86	1333,95		Gb4Cer (d18:1, C22:0)
1359,85	1359,85	1359,85	1359,95		Gb4Cer (d18:1, C24:1)
1361,86	1361,85	1361,85	1361,99		Gb4Cer (d18:1, C24:0)
1249,74	1249,77	n.d.	n.d.		nLc4Cer (d18:1, C16:0)
1359,85	1359,90	n.d.	n.d.		nLc4Cer (d18:1, C24:1)
1361,86	1361,90	n.d.	n.d.		nLc4Cer (d18:1, C24:0)

¹Protonierte $[M+H]^+$ -Molekülonen mit geringer Signalintensität sind nicht in der Tabelle aufgelistet.

²Stx1 und Stx2 binden nicht an Lc2Cer und nLc4Cer; deshalb konnten diese Strukturen nicht detektiert werden (n.d.).

Der ermittelte Fehler zwischen experimentellen und theoretischen m/z -Werten lag bei allen Anti-Lc2Cer Messungen unter 40 ppm, bei Anti-Gb3Cer unter 54 ppm, bei Anti-Gb4Cer unter 100 ppm und bei Anti-nLc4Cer unter 37 ppm.

Für die Tandem-MS-Experimente wurde Gb3Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1156,79 als Vorläuferion selektiert (vgl. **Abbildung 50 B**). Sämtliche Ionen der B- und C-Serie vom Oligosaccharidpart (Anmerkung: das B₁-Ion ist nicht im Spektrum dargestellt) und die vollständigen Serien der Y- und Z-Reihe vom Ceramidteil (Anmerkung: Z₁ und Z₂ sind

aufgrund der geringen Intensitäten nicht im Spektrum markiert) konnten nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu wurden mit dem $^{0,2}A_2$ -Ion bei m/z 305,11 und dem $^{0,2}A_3$ -Ion bei m/z 467,16 zwei Ringspaltungen detektiert und mit dem N^{II} -Ion das charakteristische Ion für das d18:1 Sphingosin nachgewiesen. Die Fragmentierung des Moleküls und die Zuordnung der Fragmentionen ist in **Abbildung 50 C** sowie zur besseren Übersicht in **Abbildung 51** dargestellt. Die detektierten Fragmente mit ihren zugehörigen m/z -Werten sind in **Tabelle 25** aufgelistet. Zudem sind die Daten aus weiteren MS-Experimenten von Gb4Cer (d18:1, C16:0) und Gb4Cer (d18:1, C24:1) aus humanem Plasma aufgelistet (Spektren nicht gezeigt).

Tabelle 25: Mittels nanoESI Q-TOF MS nachgewiesene Fragmentationen von Stx1-detektierten nGSL-Rezeptoren aus humanem Plasma und deren m/z -Werte.

Vorläuferion	Gb3Cer		Gb4Cer	
	(d18:1, C16:0) m/z 1046,67	(d18:1, C24:1) m/z 1156,75	(d18:1, C16:0) m/z 1249,73	(d18:1, C24:1) m/z 1359,87
Fragmention	m/z -Werte	m/z -Werte	m/z -Werte	m/z -Werte
$^{0,2}A_2$	305,11	305,11	¹ n.d.	¹ n.d.
$^{0,2}A_3$	467,23	467,16	¹ n.d.	¹ n.d.
B ₁ ; C ₁	185,06; 203,07	185,06; 203,09	226,08; ¹ n.d.	226,08; ¹ n.d.
B ₂ ; C ₂	347,11; 365,13	347,11; 365,13	388,13; ¹ n.d.	388,12; ¹ n.d.
B ₃ ; C ₃	509,15; 527,18	509,18; 527,18	550,17; ¹ n.d.	550,17; ¹ n.d.
B ₄ ; C ₄	-----	-----	712,25; 730,26	712,25; 730,26
Y ₀ ; Z ₀	560,53; 542,52	670,63; 652,62	560,52; 542,51	670,62; 652,61
Y ₁ ; Z ₁	722,56; 704,55	832,68; 814,65	722,55; 704,55	832,68; 814,69
Y ₂ ; Z ₂	884,62; 866,59	994,70; 976,71	884,62; 866,59	994,72; 976,73
Y ₃ ; Z ₃	-----	-----	1046,68; 1028,64	1156,79; ¹ n.d.
N^{II}	264,29	264,29	264,27	264,27

¹n.d.: nicht detektiert

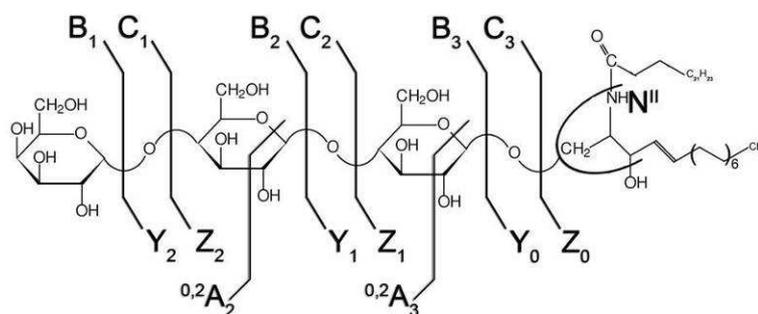


Abbildung 51: Beispielhaftes Fragmentierungsschema von Gb3Cer aus humanem Plasma. Dargestellt sind die bei der Tandem-MS von Gb3Cer (d18:1, C24:1) bei m/z 1156,64 identifizierte Fragmente (vgl. **Tabelle 25**).

Monohexosylceramide

Als Hauptkomponenten des humanen Plasmas wurden die MHC auf ihre genaue Struktur hin analysiert. Dazu wurden die nGSL aus humanem Plasma mittels Borat-Komplexen per DC getrennt, die MHC extrahiert und für die MS eingesetzt. Als Referenzen wurden GlcCer aus der Milz von Gaucher-Patienten (JM10/39) sowie GalCer aus humanem Hirn (JM10/40) verwendet.

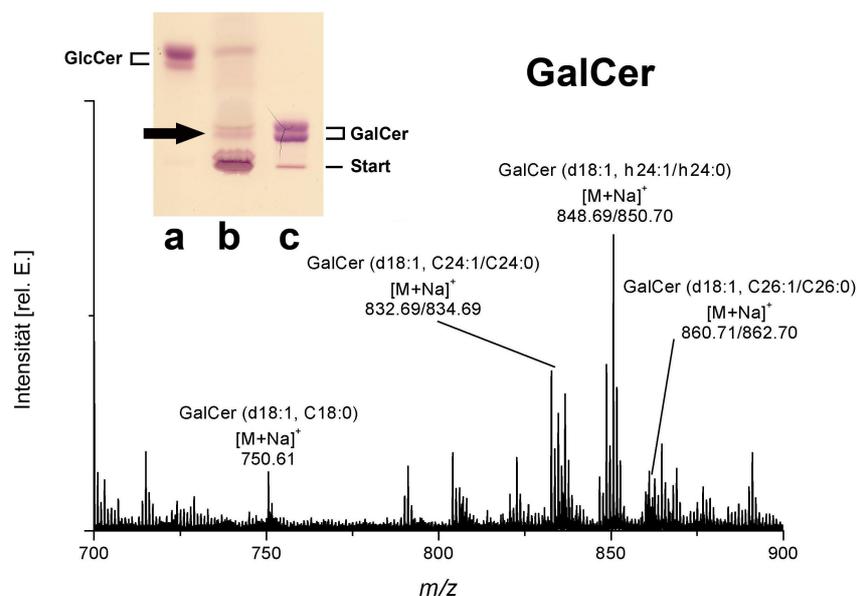


Abbildung 52: nanoESI Q-TOF Massenspektren von GalCer und GlcCer aus humanem Plasma. Dargestellt sind die MS1-Spektren von GlcCer und GalCer. Es wurden 10 μ l JM09/249 korrespondierend zu 500 μ l humanem Plasma aufgetragen und als Borat-Komplexe getrennt. Entsprechende Banden wurden aus dem Kieselgel abgekratzt, mit C/M/W (30/60/8, v/v/v) extrahiert, verdampft und in 30 μ l MeOH wiederaufgenommen. Ca. 15% der Proben wurde für die MS verwendet. Die schwarzen Pfeile deuten auf den abgekratzten Bereich, der für die MS verwendet wurde. Zum optischen Vergleich mit den DC-Overlays (**Abbildung 48**) ist in dieser Darstellung die Orcinfärbung der MHC mit aufgeführt. Für die MS-Messungen wurden hingegen zerstörungsfrei mittels Primulinfärbung detektierte Kieselgelbereiche verwendet. Die Referenzen entsprechen 7 μ g aufgereinigtem GlcCer (a) und 10 μ g GalCer (c).

Wie **Abbildung 52** zeigt, konnten mittels nanoESI Q-TOF MS sowohl bei den mit den Referenzen GlcCer aus der Milz von Gaucher-Patienten und GalCer aus humanem Hirn ko-chromatographierenden MHC aus humanem Plasma in den abgekratzten Bereichen Mono-hexosylceramide nachgewiesen werden. Detektiert wurden ausschließlich mit Natrium kationisierte Molekülspezies. Diese variierten von GlcCer (d18:1, C16:0) bei m/z 722,58 bis GlcCer (d18:1, h24:1/h24:0) bei m/z 848,67/850,67 und von GalCer (d18:1, C18:0) bei m/z 750,61 bis GalCer (d18:1, C26:1/C26:0) bei m/z 860,71/862,70. Hauptsignale in den Spektren waren GlcCer (d18:1, C24:1/C24:0) bei m/z 832,67/834,68 im oberen GlcCer Spektrum und GalCer (d18:1, h24:1/h24:0) bei m/z 848,69/850,70 im unteren GalCer Spektrum.

Tabelle 26: Mittels nanoESI Q-TOF MS detektierte Mono-hexosylceramid Molekülonen aus humanem Plasma und deren Strukturvorschläge. Die gestrichelte Line trennt die erhaltenen m/z -Werte für GlcCer und GalCer.

[M+Na] ⁺ , m/z theoretisch	[M+Na] ⁺ , m/z experimentell	Strukturvorschlag
722.55	722.58	GlcCer (d18:1, C16:0)
750.58	750.59	GlcCer (d18:1, C18:0)
778.62	778.63	GlcCer (d18:1, C20:0)
806.65	806.65	GlcCer (d18:1, C22:0)
832.66	832.67	GlcCer (d18:1, C24:1)
834.68	834.68	GlcCer (d18:1, C24:0)
848.64	848.67	GlcCer (d18:1, h24:1)
850.65	850.67	GlcCer (d18:1, h24:0)
750.58	750.61	GalCer (d18:1, C18:0)
832.66	832.69	GalCer (d18:1, C24:1)
834.68	834.69	GalCer (d18:1, C24:0)
848.64	848.69	GalCer (d18:1, h24:1)
850.65	850.70	GalCer (d18:1, h24:0)
860.69	860.71	GalCer (d18:1, C26:1)
862.71	862.70	GalCer (d18:1, C26:0)

Zur Unterscheidung, ob die Fettsäure oder das Sphingosin hydroxyliert ist, wurden die Molekülspezies mit dem Hauptsignal der GalCer-Fraktion, GalCer (d18:1, h24:1/h24:0) mit einem m/z -Wert von 848,69/850,70 mittels Tandem-MS detailliert charakterisiert (vgl. **Abbildung 53**).

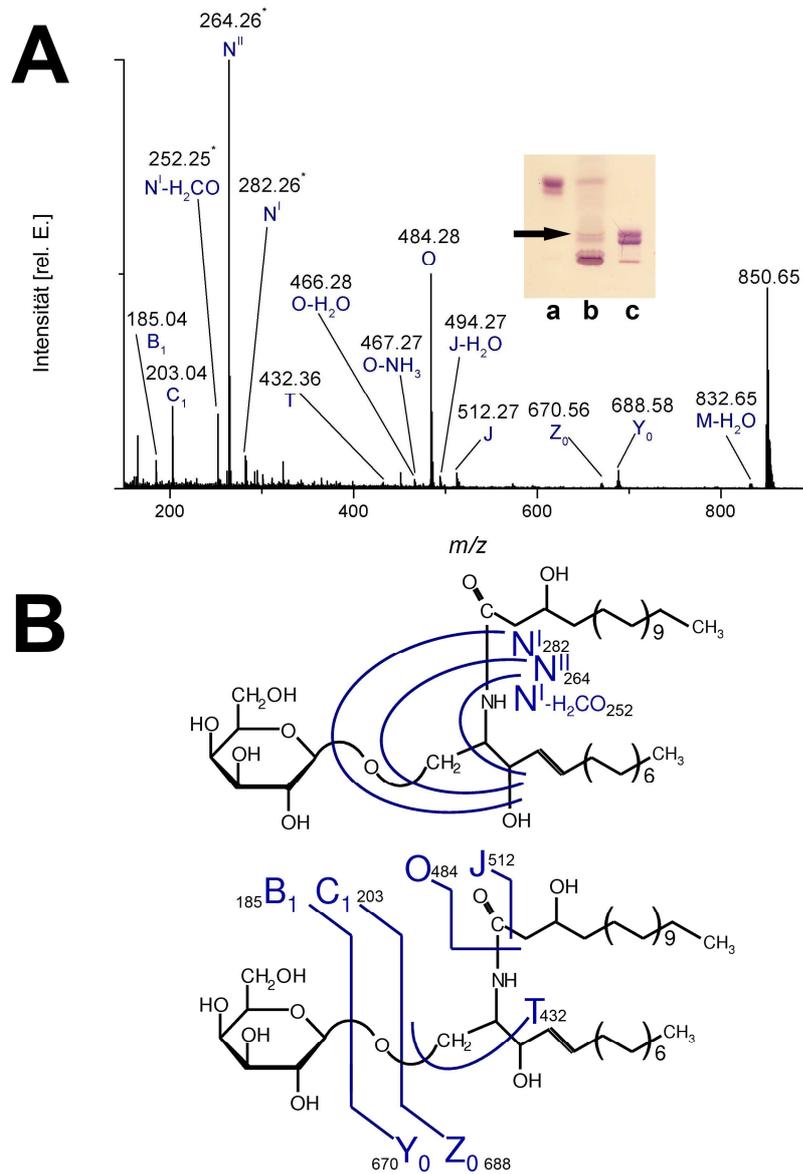


Abbildung 53: nanoESI Q-TOF Tandem Massenspektrum von GalCer (d18:1, h24:0) aus humanem Plasma. (A) Tandem-MS-Massenspektrum von Primulin-gefärbtem GalCer (d18:1, h24:0) aus humanem Plasma und (B) die dazugehörigen Fragmentierungsschemata mit allen detektierten Molekülspezies. Der schwarze Pfeil deutet den von der DC-Platte abgekratzten Bereich an. 10 μ l JM09/249 entsprechend 500 μ l Plasma wurden aufgetragen, ca. 15% davon wurden für die MS verwendet. Zum optischen Vergleich mit den DC-Overlays (**Abbildung 48**) ist in dieser Darstellung die Orcinfärbung der MHC mit aufgeführt. Für die MS-Messungen wurden hingegen zerstörungsfrei mittels Primulinfärbung detektierte Kieselgelbereiche verwendet.

Das Vorläuferionenspektrum vom Hauptsignal des GalCer aus humanem Plasma ist in **Abbildung 53** dargestellt. Bei m/z 185,04 und 203,04 wurden die B_1 und C_1 Fragmentationen detektiert, die neben dem O-Ion bei m/z 484,28 und dem J-Ion bei m/z 512,27 Fragmente mit Saccharidanteil darstellen. Fragmente, die den Ceramidpart beinhalten, konnten als die N-Ionen N^I , N^I-H_2CO und N^{II} bei m/z 282,26, m/z 252,25 und m/z 264,26 sowie als T-Fragmentation bei m/z 432,36 detektiert werden. Die nachgewiesenen Molekülspezies waren überwiegend mit Natrium kationisiert. Die mit einem * gekennzeichneten m/z -Werte stammten von protonierten GalCer-Fragmenten. Als charakteristisches Ion für die Zuordnung der Hydroxy-Gruppe ist das T-Fragment bei m/z 432,36 gefunden worden. Dieses kann nur aus einer hydroxylierten Fettsäure hervorgehen.

7.4.3 Neutrale GSI aus humanen Lipoproteinfraktionen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die GSL-Zusammensetzung von humanem Plasma im Detail bestimmt. Um jedoch die Frage der Lipoproteinassoziation zu klären, wie und in welcher Form GSL im Plasma vorliegen, wurde zusätzlich eine Lipoproteinfraktionierung des Plasmas in „Chylomikronen, VLDL und IDL“ sowie „LDL“ und „HDL“ vorgenommen und die resultierenden Fraktionen wurden auf ihren exakten GSL-Gehalt überprüft. Dazu wurden die aus den Lipoproteinfraktionen isolierten nGSL per DC-Overlay-Assay und anschließender Massenspektrometrie charakterisiert.

7.4.3.1 Dünnschichtchromatographie von nGSL aus humanen Lipoproteinfraktionen

Die aus den fraktionierten Lipoproteinen mittels Lösungsmittelextraktion gewonnenen, über alkalische Hydrolyse und Dialyse „aufgereinigten“ GSL wurden zunächst per DC getrennt. Über Overlay-Assays mit verschiedenen Anti-GSL AK bzw. Stx1/Anti-Stx1-AK sowie Stx2/Anti-Stx2-AK wurden die Einzelsubstanzen nachgewiesen. Dazu wurden Aliquots der drei Fraktionen „Chylomikronen, VLDL und IDL“, sowie „LDL“ und „HDL“, die jeweils identischen Lipoproteinmengen entsprachen, aufgetragen. Es wurden GSL-Aliquots äquivalent zu je 40 μ g Protein für den Anti-Cer-Lc2 und den Anti-nLc4Cer-Test, 60 μ g für den Anti-Gb3Cer- und den Anti-Gb4Cer-Test, sowie je 120 μ g für den Stx1/Anti-Stx1- und Stx2/Anti-Stx2-Test eingesetzt und im Laufmittel für nGSL (vgl. **Tabelle 8**) aufgetrennt.

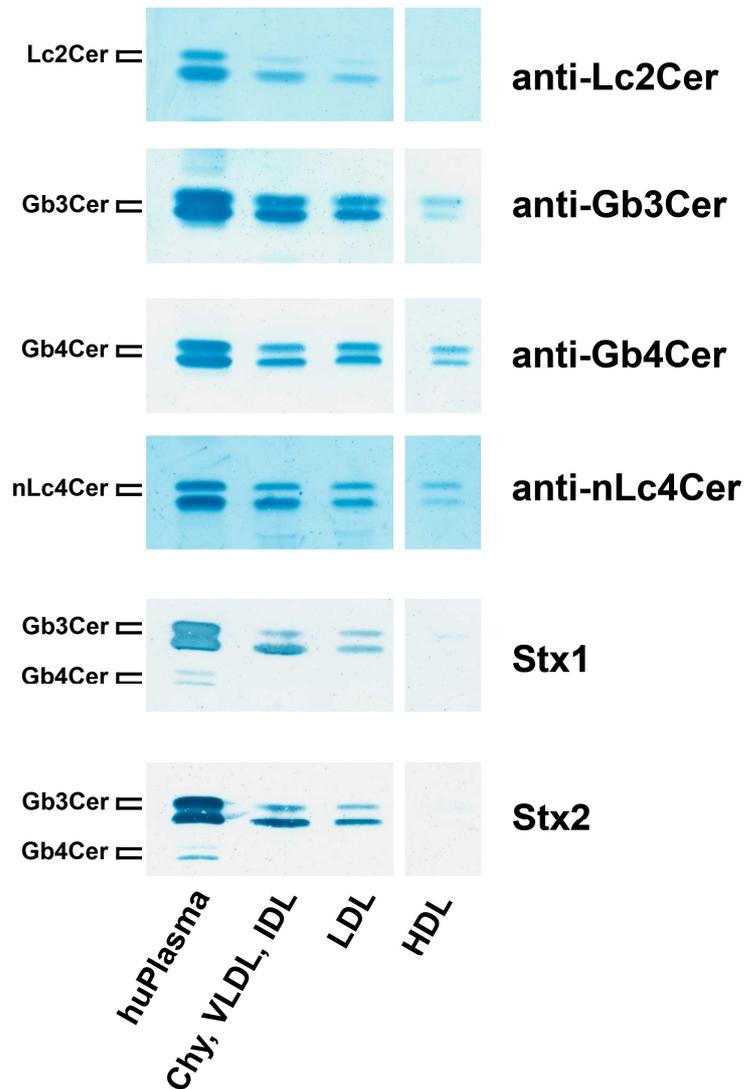


Abbildung 54: Dünnschichtchromatographische Trennung und Nachweis von nGSL in humanen Lipoproteinfraktionen. Overlay-Assay von nGSL isoliert aus Lipoproteinfraktionen (**Chy**: Chylomikronen, **VLDL**: *very low density lipoproteins*, **IDL**: *intermediate density lipoproteins*; **LDL**: *low density lipoproteins*; **HDL**: *high-density lipoproteins*) aus humanem Plasma mit Anti-Lc2Cer-, Anti-Gb3Cer-, Anti-Gb4Cer- und Anti-nLc4Cer-Antikörpern, sowie mit Stx1/Anti-Stx1- und Stx2/Anti-Stx2-Antikörpern. Aufgetragene GSL-Mengen der Proben HS01/39-1, -2 und -4 korrespondierten zu 40 µg (40 µl) Lipoproteingehalt bei den Anti-Lc2Cer- und Anti-nLc4Cer-Tests, zu 60 µg (60 µl) Lipoprotein bei den Gb3Cer- und Gb4Cer-Tests und zu je 120 µg (120 µl) Lipoprotein bei den Toxin-Tests. Die Kontrolle aus humanem Plasma entspricht 3,5 µl JM09/249 (anti-Lc2Cer) sowie 5,2 µl JM09/249 (anti-Gb3Cer bis Stx2) was zu 12100 respektive 18000 µg Gesamtprotein aus humanem Plasma korrespondiert.

Lc2Cer, die nGSL der Globoserie Gb3Cer und Gb4Cer sowie nLc4Cer konnten in den drei Lipoproteinfraktionen nachgewiesen werden. Die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer wurden dabei sowohl mittels polyklonaler AK als auch mittels Stx1/Anti-Stx1-AK bzw. Stx2/Anti-Stx2-AK detektiert. Bei allen GSL zeigte sich eine moderate bis

starke GSL-Präsenz in den Fraktionen der Chylomikronen, VLDL und IDL sowie den LDL, wohingegen nur eine schwache Färbung in der HDL-Fraktion nachgewiesen werden konnte.

(Auf eine Darstellung der massenspektrometrischen Detailcharakterisierung der GSL in Lipoproteinfraktionen aus humanem Plasma wird hier verzichtet, da es sich bei ihnen lediglich um die bereits im Humanplasma charakterisierten GSL handelt. Die durchgeführten Messungen erbrachten somit keine neuen Strukturinformationen und wurden aufgrund ihrer Redundanz nicht gezeigt.)

8 Diskussion

8.1 Stx und Stx-unabhängige Pathogenitätsfaktoren

Shiga Toxine sind die Hauptverursacher für endotheliale Zellschädigungen im menschlichen Körper. Ungeklärt hingegen ist bis heute, welchen genauen Einfluss die Stx-unabhängigen Pathogenitätsfaktoren auf EHEC-Infektionen haben, wobei über einen synergistischen Effekt Faktoren mit Stx spekuliert wird. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Virulenzfaktoren Stx1, Stx2, EHEC-Hly, EspP, Cdt, SfpA sowie EibG mittels PMF und MALDI-TOF MS auf ihre Strukturidentität hin überprüft. Dieses geschah ähnlich dem von Shevchenko et al. publizierten Verfahren (Shevchenko et al. 1996), welches auch in modifizierter Form von Müthing et al. erfolgreich für das Mistellektin I angewandt wurde (Müthing 2003).

Die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* konnten erfolgreich nachgewiesen und identifiziert werden. Stx1 konnten mit einer 72,2%igen AS-Sequenzabdeckung der 32,4 kDa großen Stx1A-Untereinheit und 88,4% der 7,7 kDa großen B-Untereinheit identifiziert werden. Für das Stx2 konnte mit 80,8% der 33,2 kDa Stx2A-Untereinheit und 92,9% der 7,8 kDa großen B-Untereinheit eine nahezu lückenlose Abdeckung der AS-Sequenzen erzielt werden. Dieses sind für In-Gel-Verdauexperimente hervorragende Sequenzabdeckungen, die in automatisierten Verfahren selten erreicht werden und die eine eindeutige Identifizierung der Proteine erlauben. Alle im Gel per Coomassie Blau gefärbten Banden wurden dabei als Stx Untereinheiten nachgewiesen, was eine hohe Reinheit der Toxine bestätigt.

Auch die anderen untersuchten Pathogenitätsfaktoren konnten zweifelsfrei identifiziert werden. Das EHEC-Hly konnte in dieser Arbeit durch 40 bestätigte Fragmente, die auch in den Datenbanken als Treffer für EHEC-Hly angegeben wurden, mit 360 der 998 AS des Proteins identifiziert werden. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von 36,1% des 104 kDa großen EHEC-Hly und untermauert die von Aldick et al. durchgeführten Studien zum EHEC-Hly und seiner Funktion in *E. coli* (Aldick et al. 2007, 2009). Internetdatenbanken zur Proteinidentifikation werten teilweise bereits 5 identifizierte Fragmente eines Proteins als erfolgreichen Treffer für eine Identifizierung, so dass bei 40 nachgewiesenen Signalen ein zweifelsfreies Ergebnis vorliegt.

Um möglichst detaillierte Informationen über das EspP aus *E. coli* zu erhalten, wurde hier eine Kombination aus zwei verschiedenen massenspektrometrischen Detektionsverfahren gewählt. Durch den Einsatz der nanoESI Q-TOF MS und der UV-MALDI-o-TOF MS konnte eine nahezu lückenlose Sequenzabdeckung von 95% erzielt werden. Dies entspricht 919 der 968 AS des 107 kDa großen Proteins. Der Einsatz dieser massenspektrometrischen Techniken konnte ergänzend zu SDS-Separationen, Antikörpertests und PCRs, die von Herrn Dr. Jens Brockmeyer durchgeführt wurden (Brockmeyer et al. 2007) eine detailliertere Strukturaufklärung für das EHEC EspP liefern (Brockmeyer in Vorbereitung). Eine solch hohe Sequenzabdeckung wird mit den in Proteomics üblichen Verfahren, 2D-Gelelektrophorese mit anschließender MALDI-TOF MS, nur selten erreicht. Die gezielte Verwendung zweier Ionisierungstechniken für die MS hebt die Strukturaufklärung in dieser Arbeit somit entscheidend von automatisierten Verfahren in den Proteomics ab.

Die im SDS-Gel getrennten Untereinheiten des *E. coli* Cdt wurden in dieser Arbeit auf ihre Identität überprüft. Mit 20 bestätigten Fragmenten konnte eine Sequenzabdeckung von 79,6% des 29,8 kDa großen CdtB erzielt werden, was 214 von 269 AS entspricht. Auch die A- und die C-Untereinheit wurden mit 126 von 258 AS (48,8%) der 27,8 kDa großen CdtA-Untereinheit sowie mit 56 von 181 AS (30,9%) des 19,9 kDa großen CdtC nachgewiesen. Durch Identifikation und den Nachweis der Proteine mittels PMF und MALDI-TOF MS konnten Informationen über die Cdt-Untereinheiten gewonnen werden, welche über der Stadium der preliminären Daten aus SDS-Separationen, Antikörper-Bindungstudien und PCR-Tests hinausreichen (Bielaszewska et al. 2006, 2009).

Die Sfp Fimbrien aus *E. coli*, bzw. das SfpA, wurde nach Separation im SDS-Gel für eine Identifikation verwendet. Mit 14 bestätigten Treffern für SfpA-Fragmente, die 141 von 174 AS abdeckten (81% der 17,9 kDa) konnte diese Überprüfung bestätigen, dass es sich bei dem extrahierten Protein um SfpA handelte. Dazu wurden entgegen der üblichen Verfahrensweisen sowohl ein tryptischer Verdau, als ein ein Verdau mit Trypsin und der Endoprotease Glu-C verwendet. Dieser kombinierte Einsatz der Proteasen ermöglichte eine weit höhere Sequenzabdeckung als der Einsatz lediglich einer Protease. Auch diese Variation des PMF erzielt gegenüber den automatisierten Verfahren wesentlich detailliertere Ergebnisse mit höheren AS-Sequenzabdeckungen. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen konnten weitere Studien mit den Fimbrien durchgeführt werden (Müsken et al. 2008).

Der siebte aus der Reihe der zu identifizierenden Pathogenitätsfaktoren war das EibG. Der nach SDS-Gelelektrophorese in dieser Arbeit durchgeführte PMF bestätigte, dass es sich bei dem exprimierten Protein um EibG handelte. Mit 35 identifizierten Verdau-Fragmenten (265 der 508 AS) von EibG konnte eine Sequenzabdeckung von 52,2% des 54 kDa großen Proteins erzielt werden. In diesem Fall war eine Überprüfung des Proteins von besonderer Wichtigkeit, da die ausgeschnittene, gefärbte Bande anhand seines Laufverhaltens im SDS-Gel einem Protein von 200 kDa entsprach. Durch die hohe Sequenzabdeckung konnte dieses Protein jedoch eindeutig als EibG identifiziert werden, so dass in Bezug auf die elektrophoretische Mobilität im Gel von einer Tetramerstruktur des Proteins ausgegangen werden muss. Diese Diskrepanz zwischen dem Laufverhalten im SDS-Gel und der tatsächlichen Aminosäuresequenz ist für herkömmliche, bzw. automatisierte Strukturaufklärungsverfahren problematisch. Über die dem Laufverhalten im SDS-Gel entsprechende Größe wird häufig in den Datenbanken eine Proteinsuche spezifiziert, so dass bei einem laut Gel 200 kDa großen Protein nicht mehr nach einem 54 kDa großen Protein gesucht wird. Dies könnte bei automatisierten Verfahren darin resultieren, dass für die Proteinsuche kein Treffer erzielt werden kann, oder schlimmstenfalls gar ein falsches Protein als wahrscheinlichstes angegeben wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die exakten Strukturcharakterisierung der Pathogenitätsfaktoren, die bisher erst als preliminäre Daten per SDS-Gelelektrophorese und AK-Bindungsstudien vorlagen, die Lücken in den Strukturidentitätsüberprüfungen geschlossen haben. Durch die Bestätigung der erfolgreichen Expression und im Falle von Stx1 und Stx2 auch der hohen Reinheit der Proteine konnten weitere Bindungsstudien mit den Toxinen durchgeföhrt werden. Mittel der in dieser Arbeit verwendeten Techniken, PMF mit anschließender MALDI-TOF MS kann zu jedem Zeitpunkt der Expressionsanalyse der Proteine, bzw. der anschließenden Aufreinigung, deren Qualität und Reinheit überprüft werden. Weiterhin kann ermittelt werden, ob Aufarbeitungsschritte zu starkem Proteinverlust führen, bzw. ein falsches Produkt aufgereinigt wird.

Die in dieser Arbeit durchgeföhrt PMF-Analysen und MALDI-TOF sowie ESI Q-TOF MS-Verfahren heben sich deutlich von in den Proteomics verwendeten Standardverfahren ab. Der Einsatz der 1D SDS-Gelelektrophorese statt 2D erspart Zeit und Arbeitsaufwand in der Präparation. Durch den für jedes Protein einzelnen optimierten Ablauf des PMF und der MS, konnten für jeden Virulenzfaktor höhere

Sequenzabdeckungen und damit bessere Ergebnisse erzielt werden, als dies in automatisierten Verfahren möglich gewesen wäre. Die Sensitivität der angewendeten Techniken liegt dabei mit ungefähr 0,5 µg für eine hohe Sequenzabdeckung des zu identifizierenden Proteins nur knapp über dem Bereich der Coomassie Blau-Färbungen (0,05-0,1 ng Dunn), so dass als Faustregel gelten kann, dass ein Coomassie Blau-gefärbtes Protein auch mittels PMF und MALDI-TOF MS identifiziert werden kann. Es bleibt letztendlich festzuhalten, dass über die Wahl der eingesetzten Proteasen beim Verdau und der Ionisierungsart bei der MS für jedes Protein separat die Strukturaufklärungsmethode optimiert werden kann, um möglichst detaillierte Informationen darüber zu erhalten.

8.2 Neutrale GSL aus humanen Endothelzellen

Die Shiga Toxin-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer konnten in beiden untersuchten Endothelzelllinien, den HBMECs und den EA.hy 926 Zellen, detektiert werden. Mittels IF-Mikroskopie konnten die Stx-Rezeptoren auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu konnten für Gb3Cer und Gb4Cer mittels DC-Overlay-Assay basierend auf den Bindungen zu den Anti-GSL-AKs und Stx1 und 2 präliminäre Strukturinformationen über die GSL gewonnen werden. Final wurden mittels nanoESI Q-TOF MS der nach DC-Overlay-Assay Detektion extrahierten Banden der exakte strukturelle Aufbau der GSL aus den Zelllinien charakterisiert.

Die IF-Mikroskopie mit Anti-GSL-AKs und Stx1 ergab deutliche Signale für den Haupt-Stx-Rezeptor Gb3Cer sowie für Gb4Cer in HBMECs. In EA.hy 926 Zellen hingegen konnte eine starke Expression von Gb3Cer gezeigt werden, jedoch nur ein extrem schwaches Signal für Gb4Cer. In den hingegen wurde dieses moderat bis stark exprimiert. Dieses Ergebnis konnte mit dem zweiten immunchemischen Verfahren, dem DC-Overlay-Assay, bestätigt werden. Auch hier zeigten beide Zelllinien eine starke Färbung für den sogenannten *high-affinity* Rezeptor Gb3Cer und lediglich die HBMECs eine Färbung für Gb4Cer (Schweppe et al. 2008).

Exakte Informationen über die GSL-Zusammensetzung in Endothelzellen sind besonders deshalb von Interesse, zumal Endothelzellschädigungen bei EHEC-Infektionen durch Stx als Hauptverursacher hervorgerufen werden und bisher nur wenige umfassende Studien über die GSL durchgeführt wurden. Die bislang am besten

auf ihre GSL-Zusammensetzung hin untersuchten humanen Endothelzellen sind *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) (Gillard et al. 1987, 1991, 1993). Eine detaillierte Strukturaufklärung aller in HUVECs detektierten GSL-Spezies über DC und *fast atom bombardement* MS (FAB MS) sowie über Methylierungsanalysen wurde von Müthing et al. 1999 veröffentlicht. Die prädominanten GSL von HUVEC sind die nGSL der Globoserie mit den Stx-Rezeptoren Gb3Cer (23%) und Gb4Cer (36%) mit MHC, Lc2Cer, nLc4Cer und nLc6Cer als Minoritäten (9%, 15%, 12% und 5%) (Müthing et al. 1999). Für das Stx aus *Shigella dysenteriae* wurde der zytotoxische Effekt auf HUVECs bereits 1988 von Obrig et al. gezeigt. In subkonfluentem Zustand der Kultur führte eine 24 stündige Inkubation mit 10^{-8} M Stx zu einer Reduktion der Lebendzellzahl um 50% (Obrig et al. 1988).

Für viele andere Zelllinien wurden zwar zahlreiche Studien über die Interaktion zwischen Endothelzellen und Stx durchgeführt, nicht jedoch über ihre exakte GSL-Expression. *Human microvascular endothelial cells* (HMECs) erwiesen sich als äußerst sensitiv gegenüber Stx1 aus *E. coli*, ebenso *human coronary artery endothelial cells* (HCAECs) (Ohmi et al. 1998). *Bovine aortic endothelial cells* (BAECs) hingegen zeigten keinerlei Sensitivität gegenüber Stx1 aus *E. coli*. Sie wiesen einen hohen Gehalt an GSL der Lakto- und Neolakto-Serie auf und besaßen keine, bzw. nur Spuren an Globoserie-GSL. MHC (28%) und Lc2Cer (40%) stellten dabei die prädominanten GSL dar, danach folgen Lc3Cer (16%) und nLc4Cer (10%) (Duvar et al. 1997).

Eines der am schwersten durch Stx geschädigten Organe des menschlichen Körpers ist die Niere. Deshalb wurden in zahlreichen Studien der Zusammenhang zwischen der Nierenendothelzerstörung und Stx untersucht. Boyd und Lingwood konnten in Nierengewebeextrakten große Mengen an Stx-Rezeptoren und Gb3Cer als das Haupt-GSL der Niere nachweisen. Sie berichteten auch, dass eine Korrelation zwischen der Bindung von Stx an Nierengewebe und dem Gehalt an Gb3Cer im Gewebe vorliegt (Boyd und Lingwood 1989). Andere Studien wurden anstelle von Gewebeprobe mit Zellkulturen durchgeführt. So stellten Louise und Obrig 1995 fest, dass *human renal microvascular endothelial cells* (HRMECs) im Vergleich zu Stx1 eine etwa 1000fach erhöhte Sensitivität gegenüber Stx2 besitzen, wohingegen HUVECs eine annähernd ähnlich geringe Sensitivität gegenüber beiden Toxinen zeigten (Louise und Obrig 1995). Da Stx2 mit besonders schwerwiegenden Symptomen im Krankheitsverlauf, wie HC und HUS assoziiert ist, könnte eine bevorzugte Bindung von Stx2 an Nierenzellen bereits eine mögliche Erklärung für seine schwerere Zellschädigung sein. Stx2 ist für

HRMECs das wesentlich stärkere zytotoxische Agens, obwohl HRMECs eine etwa 10fach größere Menge an Stx1 als Stx2 binden können (Louise und Obrig 1995). Louise und Obrig postulierten dazu in ihrer Arbeit, dass Stx1 und Stx2 an unterschiedliche Formen von Gb3Cer binden und erklärten so den beobachteten Effekt. Die Hauptbindestellen von Typ 2 (*site 2*) des Stx2 unterscheidet sich jedoch von der entsprechenden in Stx1. Vergleicht man beide, so weisen sie auch eine unterschiedliche Art der Bindung auf, so dass Fraser et al. postulierten, dass auch die abweichende Konformation der Bindestellen in den B-Untereinheiten der Toxine zu den verschiedenen Wirkmechanismen von Stx1 und Stx2 führen kann (Fraser et al. 2004).

Neben den Endothelzellen der Niere liegt ein weiterer Fokus auf den Analysen der Zellen des Darms. Hier werden Stx von *E. coli* sekretiert und können folglich im Verlauf der Infektion früheste Schädigungen hervorrufen. Jacewicz et al. führten 1999 vergleichende Studien zwischen *human intestinal microvascular endothelial cells* (HIMECs) und *human saphenous vein endothelial cells* (HSVECs) durch. Sie stellten fest, dass das Haupt-GSL mit ca. 67-75% des GSL-Gehaltes bei HIMECs Gb3Cer ist, wohingegen Gb3Cer in HSVECs lediglich 10% des Gesamtgehalts ausmacht. Dieser Befund korrelierte mit den unterschiedlichen Sensitivitäten der beiden Zelllinien, da HIMECs wesentlich empfindlicher auf Stx1 und 2 reagierten. Jacewicz et al. beobachteten außerdem, wie bereits Louise und Obrig 1995 bei Nierenendothelzellen, dass bei HIMECs des Darms, trotz einer 50fach höheren Bindekapazität für Stx1, das Stx2 eine stärkere Zytotoxizität aufwies (Jacewicz et al. 1999).

Die immense klinische Bedeutung von Gb3Cer betrifft nicht nur seine Funktion als Stx-Rezeptor und die damit verbundene Assoziation mit EHEC-Infektionen und den daraus resultierenden Erkrankungen wie HUS. Neben Endothelzellschädigungen in der Niere und im Darm treten auch cerebrale Schädigungen bei EHEC-Infektionen auf. Mittels DC und ELISA zeigten Stricklett et al. 2002, dass *human brain endothelial cells* (HBECs) Gb3Cer exprimieren und sensitiv gegenüber Stx sind (Stricklett et al. 2002). Dieses korreliert mit den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit, da auch hier Stx-Rezeptoren auf mikrovaskulären Hirnendothelzellen (HBMECs) nachgewiesen werden konnten. Der entscheidende Unterschied zwischen den in dieser Arbeit verglichenen Endothelzelllinien allerdings ist das vollständige Fehlen der Gb4Cer-Synthase und damit einhergehend der Mangel an Gb4Cer bei den EA.hy 926 Zellen. Für diesen Aspekt liegen jedoch aus den oben genannten Arbeiten keine Befunde vor.

Um den Unterschied zwischen HBMECs und EA.hy 926 Zellen bezüglich der Gb4Cer-Konzentration erklären zu können, wurde in dieser Arbeit eine RT-PCR für die Glykosyltransferasen durchgeführt, welche zur Synthese der Globoserie benötigt werden. Hier zeigte sich, dass die β 1,4-*N*-Acetyl-Galaktosaminyltransferase, die für die Synthese des Gb4Cers verantwortlich ist, in EA.hy 926 Zellen sehr gering bis gar nicht exprimiert wird. Dieser Befund erklärt das extrem geringe Vorkommen von Gb4Cer auf den makrovaskulären EA.hy 926 Zellen. Für eine weitere Hirnendothelzelllinie wurden ähnliche Daten 2002 von Hughes et al. publiziert (Hughes et al. 2002). Es wurden kommerziell verfügbare *human brain microvascular endothelial cells* (HBEC, Cell Systems, Kirkland, WA, USA) mit *human proximal tubule cells* (HPT, Clonetics, San Diego, CA, USA) auf die Expression von GlcCer-, Lc2Cer- und Gb3Cer-Synthetasen verglichen. Die Expression der Gb4Cer-Synthetase, die in der vorliegenden Studie ebenfalls untersucht wurde, wurde von Hughes et al. nicht überprüft. Zusätzlich verglichen die Autoren jedoch die Expression der α -Galaktosidase beider Zelllinien. Dabei stellten Hughes et al. fest, dass HPT gegenüber den HBECs eine erhöhte Gb3Cer-Synthetase und eine erniedrigte α -Galaktosidase Aktivität besitzen, was mit den durchgeführten Sensitivitätstest korreliert, da HPTs wesentlich sensitiver gegenüber Stx waren als HBECs. Die Expression der Synthetasen sowie der Galaktosidase kann in Endothelzellen allerdings durchaus variieren bzw. beeinflusst werden. Stricklett et al. konnten 2002 zeigen, dass eine Inkubation von *human brain endothelial cells* mit dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) zu einer erhöhten Expression der drei für die Synthese von Gb3Cer benötigten Glykosyltransferasen führt, wohingegen die Expression der α -Galaktosidase stabil bleibt. Die so behandelten Zellen wiesen nach TNF-Stimulation eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Stx1 aus *E. coli* auf (Stricklett et al. 2002). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch Clayton et al. mit Lipopolysacchariden (LPS) erzielen. In einem Affenmodell konnten sie zeigen, dass eine Injektion von LPS aus *E. coli* ins Nierengewebe des Affen (1mg pro kg Körpergewicht des Affen) in einer 1,7 bis 2,5fachen Erhöhung des Gb3Cer-Gehalts in der Niere resultierte (Clayton et al. 2005).

Neben den zahlreichen Studien über Endothelzellen, existieren auch einige Arbeiten über die Interaktionen von bakteriellen Toxinen mit dem Epithel. Alle Studien legen dabei, wie auch beim Endothel, einen besonderen Schwerpunkt auf Epithelzellen aus Niere und Darm. Insgesamt zeigt der Vergleich von Epithel- und Endothelzellen erhebliche Unterschiede in der GSL-Expression. Beide Zelltypen der Niere besitzen eine sehr hohe Konzentration an Stx-Rezeptoren (Lingwood 1994, Müthing et al. 2009),

wobei dies neben humanen Nierenepithel auch für das Epithel anderer Spezies gilt. In Ferkeln konnten nach Stx2 Injektion Nierengewebsschädigungen festgestellt werden, die vergleichbar mit Läsionen von humanen HUS-Patienten sind (Pohlenz et al. 2005). Im Darmepithel hingegen lässt sich kein Gb3Cer finden. Im Gegensatz zu den von Jacewicz 1999 getesteten Darmendothelzellen HIMEC konnten Miyamoto et al. 2006 kein Gb3Cer im Darm nachweisen (Miyamoto et al. 2006). Sie konnten stattdessen zeigen, dass im normalen sowie auch im entzündeten Kolon keine Gb3Cer-Synthetase vorhanden ist, was die Abwesenheit von Gb3Cer im Kolonepithel erklärt. Lediglich für Kolontumore ist beschrieben, dass diese häufig eine Überexpression an Stx-Rezeptoren aufweisen (Distler et al. 2008). Eine vergleichende Studie mit zwei Kolonkarzinomzelllinien wurde 2004 von Schüller et al. durchgeführt. Eine der beiden Zelllinien war dabei Gb3Cer-positiv (Caco-2) und die andere Gb3Cer-negativ (T84). Es gelang ihnen jedoch, in beiden Zelllinien, unabhängig vom Gb3Cer-Gehalt, eine Stx-Endozytose und in einzelnen Fällen auch eine Zellschädigung nachzuweisen, so dass für die Gb3Cer-negativen T84 Zellen von einem Gb3Cer unabhängigen Transportmechanismus ausgegangen werden muss (Schüller et al. 2004). Die Annahme, dass Darmepithel keine Stx-Rezeptoren besitzt wird so zwar nicht entkräftet, die Stx Aufnahme scheint jedoch über einen Rezeptor-unabhängigen Weg vonstatten zu gehen.

In dieser Arbeit wurden neben den rein analytischen Detektionsverfahren zusätzlich massenspektrometrische Detailcharakterisierungen der GSL-Strukturen durchgeführt. Beide hier verglichenen Endothelzelllinien wiesen in der IF und der DC ähnlich starke Expressionen an Gb3Cer auf, zeigten jedoch in der Feincharakterisierung deutliche Unterschiede. Die HBMECs besaßen ein etwa äquimolares Verhältnis von GSL mit kurzkettigen und langkettigen Fettsäuren. In den EA.hy 926 Zellen andererseits konnten wesentlich größere Mengen an Gb3Cer mit langkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden. Derartige Detailuntersuchungen über die exakte Zusammensetzung der Membranrezeptoren sind bis zum heutigen Zeitpunkt in vielen Studien vernachlässigt worden, jedoch deuten einige Arbeiten bereits die Wichtigkeit verschiedener Gb3Cer-Lipofornen bei der Interaktion mit Stx an. So beschrieben Kiarash et al. bereits 1994 den Effekt, dass die Rezeptorfunktion von Gb3Cer mit der Kettenlänge der enthaltenen Fettsäure variieren kann. Spezies mit extrem kurzkettigen Fettsäuren, wie C12 und C14 Fettsäuren wiesen eine geringe Affinität gegenüber Stx auf, während C16 bis C24 Fettsäuren zu einer starken Bindung führten. Dabei spielte zusätzlich der Grad der Sättigung der Kohlenstoffbindungen eine Rolle. Ungesättigte Fettsäuren erhöhten die

Bindungsstärke von Stx (Kiarash et al. 1994). In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die EA.hy 926 Zellen nicht nur einen hohen Anteil an langkettigen Fettsäuren besitzen, sondern diese auch zusätzlich zu einem Großteil ungesättigt sind. Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Arbeit von Sandvig et al. aus dem Jahr 1994 (Sandvig et al. 1994), in der ein die Einflussnahme von längerkettigen Fettsäuren auf den intrazellulären retrograden Transport festgestellt wurde, so kann durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Analysen bereits eine Vermutung über die erhöhte Sensitivität von EA.hy 926 Zellen gegenüber Stx angestellt werden, da EA.hy 926 Zellen einen wesentlich höheren Anteil an Gb3Cer mit längerkettigen und ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu HBMECs besitzen.

Für die Kopplung der Immundetektion mit der Massenspektrometrie, mit der diese Fülle an Detailinformationen generiert werden kann, wurde an dieser Stelle die von Meisen et al. 2005 entwickelte Technik verwendet. Diese ermöglicht eine direkte Kombination von immunchemischen und massenspektrometrischen Methoden und ist aus diesem Grund exzellent für Rezeptorstudien geeignet (Meisen et al. 2005). Welche Bedeutung die exakte Charakterisierung sämtlicher GSL eines Zelltyps besitzt, verdeutlicht eine Arbeit von Smith et al. aus dem Jahr 2006. Hier konnte über eine Verringerung der Konzentration von GlcCer in *Lipid Rafts* eine vollständige Protektion gegenüber Stx erreicht werden (Smith 2006). Der Fokus sollte also, wie auch in dieser Arbeit, nicht ausschließlich auf den Stx-Rezeptoren liegen, sondern muss das gesamte GSL-Repertoire („Glykosphingolipidom“) beinhalten. Zudem gilt es in späteren Arbeiten das Untersuchungsfeld auf GSL in Supramolekularen Strukturen, wie z. B. den *lipid rafts*, zu erweitern und die Rolle von Mikrodomänenstrukturen auf den Zelloberflächen beim Krankheitsverlauf durch EHEC-Infektionen aufzuklären.

8.3 Neutrale GSL aus FCS

Rinder stellen das Hauptreservoir für EHEC dar, ohne selbst an Infektionskrankheiten wie HC oder HUS zu leiden. Sie sind symptomlose Ausscheider und können somit ohne sichtbare Auswirkungen Träger für EHEC sein. Folglich stellt sich unter anderem die Frage, ob sich in Rinderseren Stx-Rezeptoren nachweisen lassen, da GSL im Serum als potentielle Stx-Transporteure gelten. In dieser Arbeit ist es gelungen eine genaue

Charakterisierung der GSL aus FCS durchzuführen und festzustellen, dass Stx-Rezeptoren im FCS auftreten. Dabei waren die GSL der Globoserie, Gb3Cer und Gb4Cer, die am häufigsten vorkommenden Spezies. Dies konnte mittels DC-Overlay-Assay und anschließender MS-Analyse zweifelsfrei gezeigt werden, wobei Gb3Cer in wesentlich geringeren Mengen in FCS als in humanem Plasma vorliegt.

Die Beantwortung der Frage zur Präsenz der Stx-Rezeptoren in FCS ist jedoch nicht nur für den Aspekt, dass Rinder als Träger für pathogene *E. coli* fungieren von Bedeutung, sondern ist auch für die Durchführung von Zellkulturexperimenten wichtig, da in vielen gängigen Zellkulturmedien FCS ein Hauptbestandteil ist. So konnten Fishman et al. bereits 1978 zeigen, dass Fibroblasten durch eine Kultivierung mit 10% FCS das Gangliosid GM1 aufnehmen und so sensitiv gegenüber dem Cholera Toxin wurden, da GM1 der Rezeptor für das Toxin ist (Fishman et al. 1978). Für eine Vielzahl weiterer GSL wurde dieser Effekt bereits mehrfach demonstriert. Satomi et al. führten 1981 Studien mit Hirngewebe durch, in denen sie durch Einsatz radioaktiv markierter Fettsäuren feststellten, dass aus dem Kulturmedium GSL aufgenommen wurden (Satomi und Kishimoto 1981). Weiterhin konnten Chigorno et al. zeigen, dass Sphingolipide aus dem FCS aufgenommen, in die Lysosomen internalisiert und dort direkt verstoffwechselt wurden (Chigorno et al. 2005).

Einer der wichtigsten Bestandteile von Seren ist das Albumin, ein ca. 66 kDa großes, nicht glykosyliertes Protein, welches den kolloidosmotischen Druck im Blut aufrechterhält und in den Fettsäuretransport involviert ist. Außerdem ist bekannt, dass bovines Serumalbumin multiple Komplexe mit GM1 eingehen kann (Tomasi et al. 1980). Sowohl im Monomierzustand, als auch nach Überschreiten der kritischen Mizellkonzentration, ab der GSL als Mizellen vorliegen, bildete sich dieser Albumin-GSL-Komplex aus. Diese Ergebnisse konnten auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Venerando et al. 1982). Ob diese Albumin-GSL-Komplexe einen Effekt auf die Aufnahme von GSL aus dem Medium in kultivierte Zellen haben, ist jedoch noch nicht im Detail bekannt, da die genannten Studien auf *in vitro* Experimenten beruhen und, wie im nachfolgenden Kapitel diskutiert, *in vivo* keinerlei Albumin-Assoziation von GSL festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei einer Kultivierung von humanen Zellen mit FCS zu beachten ist, dass GSL im FCS enthalten sind. Zellen können GSL unter Umständen aus dem Kulturmedium aufnehmen, so dass es zu einer Veränderung der

Membranzusammensetzung abhängig von den Kultivierungsbedingungen kommen kann. Dieses könnte unter Umständen zu falsch positiven Ergebnissen bei der Auswertung von GSL-Analysen und zu Fehlinterpretationen bei Zytotoxstudien führen. Unter diesen Bedingungen kann nicht mehr zwischen endogenen, von den Zellen selbst produzierten, und exogenen, aus dem Medium aufgenommenen, GSL unterschieden werden, was gerade bei Zellen mit einem sehr geringen Gehalt von GSL zu Schwierigkeiten in der Interpretation der Daten führen kann. Um letztendlich aufzuklären, mit welchen Bestandteilen des menschlichen Blutes GSL assoziieren wurde anschließend humanes Plasma untersucht.

8.4 Neutrale GSL aus humanem Plasma

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Stx-Rezeptoren unter den GSL im humanen Plasma sehr hoch ist. Neben den Hauptbestandteilen MHC und Lc2Cer (31,3% und 29,7%) sind die Rezeptoren Gb3Cer (18,1%) sowie Gb4Cer (16,2%) sehr stark vertreten, nLc4Cer ist mit 4,2% hingegen nur in geringen Mengen vorhanden. Des Weiteren wurde in Lipoproteinfraktionen eine eindeutige Lipoproteinassoziation der GSL, die im humanen Plasma vorkommen nachgewiesen. Die Stx-Rezeptoren befanden sich zu einem Großteil in den Fraktionen der Chylomikronen, des IDL und VLDL, sowie der Fraktion des LDL, eher weniger in der HDL-Fraktion. Dieses Ergebnis korreliert mit den Studien von Dawson et al. aus dem Jahr 1976. Sie stellten bereits fest, dass der Gesamt-GSL-Gehalt im VLDL und LDL doppelt so hoch ist wie im HDL (Dawson et al. 1976). Zusätzlich konnten Senn et al. 1989 zeigen, dass ca. 98% aller humanen Serunganglioside lipoproteinassoziiert vorliegen und sich dabei auf LDL (66%), HDL (25%) und VLDL (7%) verteilen (Senn et al. 1989).

Modelle über Bindungen von Stx an Bestandteile des menschlichen Blutes unterscheiden sich mitunter stark voneinander. Auch aus diesem Grund ist der Transportmechanismus der Shiga Toxine über das Blutgefäßsystem bis heute noch nicht vollständig geklärt. Wie oben beschrieben konnten sowohl Dawson (Dawson et al. 1976) als auch Senn (Senn et al. 1989) eine Lipoproteinassoziation von GSL feststellen, jedoch zeigten te Loo et al. 2000, dass keinerlei Bindung an Lipoproteine erfolgte. In der gleichen Arbeit konnten sie zeigen, dass Stx an *polymorphonuclear leukocytes* (PMNs) binden. Dieses konnte auch durch spätere Publikationen bestätigt werden.

Griener et al. Wiesen 2007 eine Bindung von Stx2 an humane Neutrophile nach, jedoch erfolgte diese über einen Gb3Cer unabhängigen Mechanismus (Griener et al. 2007), da Neutrophile kein Gb3Cer besitzen (Macher und Klock 1980, Fukuda et al. 1985). Dieser Gb3Cer unabhängige Mechanismus könnte für den Stx Transport im Blut wichtig sein. Der Transport der Moleküle endet an den Zielzellen, so dass die Toxine schließlich dort wieder freigesetzt, und auf Endothelzellen transferiert werden müssen. In diesem Zusammenhang könnte ein 2006 entdecktes Peptidmimikri eine Rolle spielen. Dieses wies eine deutlich schwächere Bindung zu den Toxinen auf als der Rezeptor Gb3Cer und könnte so am Transport der Toxine beteiligt sein (Miura et al. 2006). Diese schwächere Bindung des Toxins zum Transportmolekül im Vergleich zum Rezeptor Gb3Cer wäre eine mögliche Erklärung, da der Rezeptor somit über eine höhere Affinität zum Toxin das Transportmolekül verdrängen würde.

Abschließend sei auch an dieser Stelle noch einmal betont, von welcher entscheidenden Bedeutung eine exakte Charakterisierung aller GSL-Bestandteile in den Zelllinien und Serentypen ist. Eine Verringerung von GlcCer in *Lipid Rafts* führt zu einer vollständigen Protektion gegenüber Stx (Smith et al. 2006). Die in dieser Arbeit durchgeführte Studie über die Monohexosylceramide des humanen Plasmas zeigte, dass etwa die Hälfte aller Monohexosylceramide in humanem Plasma Glukosylceramide sind. Gerade in Betracht auf die Studie von Smith et al. mit der Bedeutung des GlcCer bei der Intoxikation, sollten die MHC Bestandteile in Zukunft in die Analysen mit eingeschlossen werden.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) verursachen Lebensmittel-assoziierte Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Das Krankheitsspektrum reicht dabei von Diarrhöe, über eine hämorrhagische Kolitis (HC) bis hin zum hämolytisch urämischem Syndrom (HUS). Schwerste Schädigungen erleidet hierbei das Gewebe der Niere, was in besonders kritischen Fällen zu ca. 2-5% zum vollständigen Nierenversagen oder sogar zum Tod der häufig sehr jungen Patienten führen kann. EHEC sezernieren zahlreiche Toxine und besitzen eine Vielzahl von membranständigen Virulenzfaktoren, die am physiologischen Krankheitsverlauf beteiligt sind. Darunter sind die Shiga Toxine (Stx) Stx1 und Stx2 die bedeutendsten und zugleich auch best-untersuchten. Aber auch für andere, Stx-unabhängige Pathogenitätsfaktoren wird eine Einflussnahme auf die EHEC-Infektionen und den damit einhergehenden Krankheitsverlauf vermutet. Auf dem Gebiet der EHEC-Virulenzfaktorforschung ist von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Helge Karch am Institut für Hygiene der WWU Münster in den vergangenen zehn Jahren eine weltweit beachtete Pionierarbeit geleistet worden. Zahlreiche Erstbeschreibungen von Toxinen aus EHEC und deren Isolierung lieferten die Grundlage für die detaillierten Analysen, die in der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden. Zu den Stx-unabhängigen Pathogenitätsfaktoren zählen sekretierte Toxine wie das EHEC-Hämolysin (EHEC-Hly), die extrazelluläre, Plasmid-kodierte Serinprotease (EspP) und das *cytolethal distending toxin* (Cdt) sowie membranständige, adhäsive Faktoren wie das Fimbrienprotein SfpA und das Immunglobulin bindende Protein EibG.

Sieben Virulenzfaktoren aus EHEC, und zwar Stx1, Stx2, EHEC-Hly, EspP, Cdt, SfpA und das EibG, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Peptidmassenfingerringdruck-Analyse (PMF) und anschließender MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) auf ihre Strukturidentität charakterisiert. Bis zu diesem Zeitpunkt basierten die Strukturinformationen lediglich auf SDS-Gelen und Westernblot-Analysen. Die MALDI-TOF MS von Stx1 ergab für die Stx1A-Untereinheit eine 72,2%ige und für die Stx1B-Untereinheit eine 88,4%ige Aminosäure(AS)-Sequenzabdeckung. Für das Stx2 konnten eine 80,8%ige AS-Sequenzabdeckung der Stx2A-Untereinheit und eine 92,9%ige der B-Untereinheit erzielt werden. Mit 40 nachgewiesenen Peptidfragmenten und einer AS-Sequenzabdeckung von 36,1% wurde die Strukturidentität von EHEC-Hly

bewiesen. Die im Vergleich zu den hohen Sequenzabdeckungen von Stx1 und Stx2 relativ geringe Abdeckung von 36,1% war absolut ausreichend, so dass das Protein zweifelsfrei identifiziert werden konnte. In Internetdatenbanken werden bereits 5 bestätigte Fragmente für eine Identifikation als ausreichend gewertet. Um zu demonstrieren, wie auch von relativ großen Proteinen mittels In-Gel-Verdau und anschließendem PMF hervorragende Sequenzabdeckungen erzielt werden können, wurde für das 107 kDa große EspP eine Kombination zweier Ionisierungstechniken für die MS verwendet, und zwar die MALDI und die ESI. Durch ihre verschiedenen Ionisierungsprozesse und die daraus resultierenden Spektren konnte die AS-Sequenzabdeckung für das EspP auf insgesamt 95% des 107 kDa Proteins erhöht werden. Die drei Cdt-Untereinheiten wurden mit 48,8% Abdeckung für die CdtA-Untereinheit, 79,6% für die B-Untereinheit und 30,9% für die C-Untereinheit erfolgreich identifiziert. Insgesamt 14 bestätigte „Treffer“ für SfpA-Fragmente lieferten eine 81%ige Abdeckung der AS-Sequenz von SfpA, was durch den kombinierten Einsatz von Trypsin und einem Gemisch aus Trypsin und der Endoprotease Glu-C mittels PMF gelang. Der Einzelverdau nach dem Standard-PMF-Verfahren, in dem ausschließlich Trypsin verwendet wurde, lieferte lediglich eine Sequenzabdeckung von 62%, so dass durch die Methodenoptimierung eine Steigerung um etwa 20% erzielt werden konnte. Für das EibG als siebten Pathogenitätsfaktor konnte schließlich die AS-Sequenz mit einer Abdeckung von 52,2% abgeleitet werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten Virulenzfaktoren konnten somit hinsichtlich der vorgeschlagenen Struktur bestätigt werden.

Dass Schlüsselereignis für die Zellschädigungen im Verlauf einer EHEC-Infektion ist die Interaktion von Stx mit Zellen des Endothels und die damit verbundene zytotoxische Wirkung. Aus diesem Grund wurden zwei Endothelzelllinien, die mikrovaskulären HBMECs und die makrovaskulären EA.hy 926 Zellen, auf ihr jeweiliges GSL-Repertoire untersucht und ihr exaktes GSL-Spektrum, mit besonderem Fokus auf die Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer, ermittelt. Die drei GSL Lc2Cer, Gb3Cer und Gb4Cer wurden mit polyklonalen Anti-GSL-AK nachgewiesen, wobei Gb3Cer zusätzlich über seine Bindung zu Stx1 detektiert wurde. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) konnte in HBMECs eine moderate Expression an Lc2Cer und Gb4Cer, aber eine starke Expression an Gb3Cer festgestellt werden. Die EA.hy 926 Zellen wiesen hingegen starke Färbungen hinsichtlich des Gehalts an Lc2Cer und Gb3Cer auf. Allerdings wurde Gb4Cer auf den EA.hy 926 Zellen nicht detektiert. Dieser Befund konnte mittels RT-

PCR über eine Expressionsanalyse der Glykosyltransferasen beider Zelllinien erklärt werden. Sowohl HBMECs als auch EA.hy 926 Zellen wiesen eine starke Expression der Lc2Cer-Synthetase und der Gb3Cer-Synthetase auf, wohingegen lediglich die HBMECs positiv bezüglich der Gb4Cer-Synthetase waren. EA.hy 926 Zellen exprimieren somit keine Gb4Cer-Synthetase, was das Fehlen von Gb4Cer erklärt.

Neben dem Nachweis der neutralen GSL auf intakten Endothelzellen mittels IFM wurden zusätzlich GSL-Isolate beider Zelllinien auf ihre GSL-Zusammensetzung analysiert. Dazu wurden die isolierten neutralen GSL mittels Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt, im anschließenden Overlay-Assay mit Antikörpern und Stx detektiert und deren Strukturen per ESI Q-TOF MS hinsichtlich des Oligosaccharid- und Ceramidteils ermittelt. Die dünnschichtchromatographische Trennung der GSL-Isolate bestätigte die Ergebnisse der IFM. Lc2Cer war in EA.hy 926 Zellen stärker vertreten als in den HBMECs. Gb3Cer war in beiden Zelllinien stark präsent, wohingegen Gb4Cer ausschließlich in den HBMECs auftrat. Die anschließende massenspektrometrische Strukturcharakterisierung ergab, dass Gb3Cer aus HBMECs ausschließlich Sphingosin (d18:1) im Ceramidteil aufwies. Bezüglich der Heterogenität im Lipidanker, die sich typischerweise in einem Doppelbandenmuster in der DC zeigt, ist für HBMECs ein äquimolares Verhältnis aus Gb3Cer mit langkettigen (C24:1/C24:0) und kurzkettigen Fettsäuren (C16:0) im Ceramidpart charakteristisch. EA.hy 926 Zellen hingegen enthalten zu etwa 75% Gb3Cer-Spezies mit langkettigen Fettsäuren. Im ESI Q-TOF-Massenspektrum von EA.hy 926-GSL- und HBMEC-Isolaten konnte zusätzlich zu den Hauptkomponenten in geringen Mengen auch Gb3Cer (d18:1, C22:0) nachgewiesen werden. Die Hauptkomponenten wurden mittels Fragmentationenanalyse per Tandem-MS im Detail strukturell bestimmt und konnten über das Auftreten vollständiger Fragmentserien der B-, C-, Y- und Z-Ionen-Serie vollständig charakterisiert werden. Bei den detektierten Ionen handelte es sich überwiegend um einfach geladene, mit Natrium kationisierte Molekülspezies.

FCS als Kultivierungssupplement wurde auf die GSL-Zusammensetzung und den Stx-Rezeptorgehalt im Speziellen analysiert. Dabei konnten in neutralen GSL-Isolaten sowohl per AK- als auch per Stx1-Bindung deutlich nachweisbare Mengen an Gb3Cer und Gb4Cer mittels DC detektiert werden. Die beiden Stx-Rezeptoren erwiesen sich dabei als die dominanten GSL im FCS. Die präliminären AK-basierenden Strukturdaten wurden in der anschließenden ESI Q-TOF MS mittels vollständiger Strukturaufklärung per Tandem-MS vervollständigt. Dabei wurden in FCS die Stx-Rezeptoren Gb3Cer

(d18:1, C16:0) und Gb3Cer (d18:1, C18:0) in leichtem Überschuss im Vergleich zu Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) detektiert. Weiterhin konnten länger-kettige GSL der Globoserie im FCS mit dem polyklonalen Anti-Gb3Cer-AK nachgewiesen werden, die jedoch keinerlei Bindungsverhalten zum Stx1 zeigten.

Abschließend wurde die GSL-Zusammensetzung des humanen Plasmas und die Assoziation von GSL mit Lipoproteinen untersucht, um Hinweise auf einen möglichen Stx-Transportmechanismus durch das Blutgefäßsystem mit Lipoproteinen als potentielle Transporteure zu erhalten. Über DC-Overlay-Assays mit neutralen GSL-Isolaten aus humanem Plasma konnte festgestellt werden, dass die neutralen GSL der Globoserie Gb3Cer und Gb4Cer zu den Haupt-GSL des Plasmas gehören. Die Quantifizierung ergab 31,3% MHC, 29,7% Lc2Cer, 18,1% Gb3Cer, 16,2% Gb4Cer und 4,2% nLc4Cer, wobei die gesamten GSL mit Hilfe von AK und im Falle der Stx-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer auch über eine Bindung zu Stx1 und Stx2 ermittelt wurden. Die präliminären AK- und Toxin-basierten Strukturvorschläge konnten mittels ESI Q-TOF MS der Stx-Rezeptoren mit harten Strukturdaten verifiziert werden. Als Haupt-Gb3Cer-Spezies in humanem Plasma wurden Gb3Cer (d18:1, C16:0), Gb3Cer (d18:1, C22:1/C22:0) und Gb3Cer (d18:1, C24:1/C24:0) identifiziert. Darüber hinaus konnten auch Minoritäten wie Gb3Cer (d18:1, C18:0) und Gb3Cer (d18:1, C20:0) nachgewiesen werden. Die Hauptkomponenten wurden zusätzlich mittels Tandem-MS und Fragmentationsanalyse mit vollständigen Fragmentserien in ihrer Struktur bewiesen. Über eine dünnschichtchromatographische Trennung und anschließendem Overlay-Assay mit GSL-Isolaten aus isolierten Lipoproteinfraktionen konnte eine eindeutige Assoziation der Stx-Rezeptoren mit VLDL und LDL und in geringerem Maße mit HDL festgestellt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine exakte Strukturaufklärung von EHEC-Pathogenitätsfaktoren sowie auch ihrer Rezeptoren von großer Wichtigkeit und die Voraussetzung dafür ist, in Zukunft den genauen Wirkmechanismus der Virulenzfaktoren aufzuklären. Für Stx1 und Stx2 ist dieser Mechanismus bereits in Ansätzen beschrieben, über die Stx-unabhängigen Faktoren ist hingegen bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Im Gegensatz zu Stx, deren GSL-Rezeptoren Gb3Cer und Gb4Cer bereits bekannt sind, sind die Rezeptoren der anderen Pathogenitätsfaktoren noch unbekannt. Es stellt sich außerdem die Frage, ob die Stx-unabhängigen Virulenzfaktoren möglicherweise einen synergistischen Effekt auf die Wirkung von Stx zeigen. Jedoch bleiben auch bei den bislang am besten charakterisierten Stx1 und Stx2

noch viele Fragen offen. Der intrazelluläre retrograde Transportmechanismus wurde zwar für HeLa Zellen und andere Zelltypen gezeigt, ist bis dato jedoch noch nicht für Endothelzellen nachgewiesen worden. Ob Stx1 und Stx2 bei verschiedenen Zelltypen möglicherweise andere bzw. unterschiedliche intrazelluläre Transportwege benutzen, bleibt also weiterhin unklar. Auch die Rolle von supramolekularen Strukturen bei der Organisation von GSL in *lipid rafts* muss in Zukunft noch intensiver untersucht werden, da die Verteilung der GSL in diesen Mikrodomänen Einfluss auf die Endozytose und damit auf die retrograde Route der Pathogenitätsfaktoren nehmen könnte.

Anhang A: Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Kodierung	1-Buchstaben-Kodierung	Inkrementmasse [Da]
Alanin	Ala	A	71,08
Arginin	Arg	R	156,19
Asparagin	Asn	N	114,10
Asparaginsäure	Asp	D	115,09
Cystein	Cys	C	103,14
Glutamin	Gln	Q	128,13
Glutaminsäure	Glu	E	129,11
Glycin	Gly	G	57,05
Histidin	His	H	137,14
Isoleucin	Ile	I	113,16
Leucin	Leu	L	113,16
Lysin	Lys	K	128,17
Methionin	Met	M	131,20
Phenylalanin	Phe	F	147,18
Prolin	Pro	P	97,12
Serin	Ser	S	87,08
Threonin	Thr	T	101,10
Tryptophan	Trp	W	186,21
Tyrosin	Tyr	Y	163,17
Valin	Val	V	99,13

Anhang B: Chemikalien

Chemikalie	Strukturformel/ Synonym	Hersteller
Acetonitril		Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	NH_4HCO_3	Merck KGaA, Darmstadt
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
bovines Serumalbumin (Fraktion V)		Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	CaCl_2	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Chloroform		Merck KGaA, Darmstadt
DAPI	4'-6-Diamidin-2'-phenylindol-dichlorid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	Merck KGaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol		Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Glycin		Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe
Iodacetamid		Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Riedel-de Haen, Seelze
Magnesiumchlorid	MgCl_2	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	MeOH	Merck KGaA, Darmstadt
Mowiol		Calbiochem, Darmstadt
Natriumazid	NaN_3	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumborat	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
n-Hexan		Merck KGaA, Darmstadt
Orcin	3,5-Dihydroxytoluol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd		Fischar, Saarbrücken
Phosphopentoxid	P_2O_5	Merck KGaA, Darmstadt
Plexigum	Polyisobutylmethacrylat	Röhm, Darmstadt
Primulin		Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Salzsäure	HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure	H_2SO_4	Riedel-de Haen, Seelze
Tween 21		ICI, Surfactans, Wilton; UK
Wasser	H_2O	
Zinkchlorid	ZnCl_2	Merck KGaA, Darmstadt

Literaturverzeichnis

- Adams J and Ann Q. Structure determination of sphingolipids by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 1993; 12: 51-85.
- Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 2001; 101: 269-95.
- Aldick T, Bielaszewska M, Uhlin BE, Humpf HU, Wai SN and Karch H. Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. *Mol Microbiol* 2009; 71: 1496-508.
- Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich AW, Kim KS, Schmidt MA and Karch H. Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect* 2007; 9: 282-90.
- Almog R and Shirey TL. A modified orcinol test for the specific determination of RNA. *Anal Biochem* 1978; 91: 130-7.
- Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA and Karch H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun* 2004; 72: 1812-6.
- Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T and Karch H. Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun* 2005; 73: 552-62.

- Bielaszewska M, Stoewe F, Fruth A, Zhang W, Prager R, Brockmeyer J, Mellmann A, Karch H and Friedrich AW. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2061-6.
- Boesze-Battaglia K, Besack D, McKay T, Zekavat A, Otis L, Jordan-Sciutto K and Shenker BJ. Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 2006; 8: 823-36.
- Boyd B and Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 1989; 51: 207-10.
- Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, Humpf HU and Karch H. Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: Distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6351-9.
- Brockmeyer J, Lindner H, Sarg B, Schweppe CH and Karch H. Characterisation of the extracellular serine protease EspP. *J Bacteriol* (in Vorbereitung).
- Brockmeyer J, Schweppe CH, Kuczius T and Karch H. Functional characterization of the serine protease autotransporter EspP from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2008; 298: 26.
- Brockmeyer J, Schweppe CH, Müthing J, Bielaszewska M, Kehrel B and Karch H. EspP α from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves P-selectin. *Thromb Haemost* (in Vorbereitung).

- Brunder W, Schmidt H and Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor. *V Mol Microbiol* 1997; 24: 767-78.
- Cao L, Bandelac G, Volgina A, Korostoff J and DiRienzo JM. Role of aromatic amino acids in receptor binding activity and subunit assembly of the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2008; 76: 2812-21.
- Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. *Eur J Biochem* 1998; 257: 293-8.
- Chigorno V, Giannotta C, Ottico E, Sciannamblo M, Mikulak J, Prinetti A and Sonnino S. Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized. *J Biol Chem* 2005; 280: 2668-75.
- Cieslak PR, Barrett TJ, Griffin PM, Gensheimer KF, Beckett G, Buffington J and Smith MG. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 1993; 342: 367.
- Clayton F, Pysker TJ, Lou R, Kohan DE, Denkers ND, Tesh VL, Taylor FB Jr and Siegler RL. Lipopolysaccharide upregulates renal shiga toxin receptors in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *Am J Nephrol* 2005; 25: 536-40.
- Dawson G, Kruski AW and Scanu AM. Distribution of glycosphingolipids in the serum lipoproteins of normal human subjects and patients with hypo- and hyperlipidemias. *J Lipid Res* 1976; 17: 125-31.
- Die Welt *online*. Schüler nach Ausflug auf Intensivstation.. www.welt.de 19. 05. 2008

- Distler U, Souady J, Hülsewig M, Drmić-Hofman I, Haier J, Denz A, Grützmann R, Pilarsky C, Senninger N, Dreisewerd K, Berkenkamp S, Schmidt MA, Peter-Katalinic J and Müthing J. Tumor-associated CD75s- and iso-CD75s-gangliosides are potential targets for adjuvant therapy in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2464-75.
- Domon B and Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconj J* 1988; 5: 397-409.
- Domon B and Costello CE. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 1988; 27: 1534-43.
- Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM and Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002; 70: 6761-9.
- Dutta PR, Cappello R, Navarro-García F and Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun* 2002; 70: 7105-13.
- Duvar S, Peter-Katalinić J, Hanisch FG and Müthing J. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vitro* propagated bovine aortic endothelial cells. *Glycobiology* 1997; 7: 1099-109.
- Edgell CJS, McDonald CC and Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3734-7.

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.
- Fishman PH, Bradley RM, Moss J and Manganiello VC. Effect of serum on ganglioside uptake and cholera toxin responsiveness of transformed mouse fibroblasts. *J Lipid Res* 1978; 19: 77-81.
- Forsgren A and Sjöquist J. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. *J Immunol* 1966; 97: 822-7.
- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD and James MN. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 2004; 279: 27511-7.
- Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, Xu JG, Tschape H and Karch H. Cytotoxic distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1844-6.
- Friedrich AW, Nierhoff KV, Bielaszewska M, Mellmann A and Karch H. Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4697-701.
- Fukuda MN, Dell A, Oates JE, Wu P, Klock JC and Fukuda M. Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 1067-82.

- Garred Ø, van Deurs B and Sandvig K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 1995; 270: 10817-21.
- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz Med Wochenschr* 1955; 85: 905-9.
- Gianviti A, Tozzi AE, De Petris L, Caprioli A, Ravà L, Edefonti A, Ardissino G, Montini G, Zacchello G, Ferretti A, Pecoraro C, De Palo T, Caringella A, Gaido M, Coppo R, Perfumo F, Miglietti N, Ratsche I, Penza R, Capasso G, Maringhini S, Li Volti S, Setzu C, Pennesi M, Bettinelli A, Peratoner L, Pela I, Salvaggio E, Lama G, Maffei S and Rizzoni G. Risk factors for poor renal prognosis in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 1229-35.
- Gillard BK, Heath JP, Thurmon LT and Marcus DM. Association of glycosphingolipids with intermediate filaments of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* 1991; 192: 433-44.
- Gillard BK, Jones MA and Marcus DM. Glycosphingolipids of human umbilical vein endothelial cells and smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 435-45.
- Gillard BK, Thurmon LT and Marcus DM. Variable subcellular localization of glycosphingolipids. *Glycobiology* 1993; 3: 57-67.
- Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, Theiss D, Lehrach H and Nordhoff E. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* 2001; 73: 434-8.

- Griener TP, Mulvey GL, Marcato P and Armstrong GD. Differential binding of Shiga toxin 2 to human and murine neutrophils. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1423-30.
- Heidemann R, Riese U, Lütkemeyer D, Büntemeyer H and Lehmann J. The Super-Spinner: a low cost animal cell culture bioreactor for the CO₂ incubator. *Cytotechnology* 1994; 14: 1-9.
- Horneffer V, Dreisewerd K, Lüdemann HC, Hillenkamp F, Läge M and Strupat K. Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *Int J Mass Spectrom* 1999; 185/186/187: 859-70.
- Hughes AK, Ergonul Z, Stricklett PK and Kohan DE. Molecular basis for high renal cell sensitivity to the cytotoxic effects of shigatoxin-1: upregulation of globotriaosylceramide expression. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2239-45.
- Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Lincicome LL, Fiocchi C and Keusch GT. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* 1999; 67: 1439-44.
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA and Karch H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 2003; 71: 3634-8.
- Johannes L and Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther* 2005; 12: 1360-8.

- Karas M and Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60: 2299-301.
- Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M and Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 229-43.
- Karmali MA, Steele BT, Petric M and Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; 1: 619-20.
- Keusch GT, Grady GF, Mata LJ, McIver J. The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. I. Enterotoxin production by *Shigella dysenteriae* I. *J Clin Invest* 1972; 51: 1212-8.
- Kiarash A, Boyd B and Lingwood CA. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. *J Biol Chem* 1994; 269: 11138-46.
- Kitova EN, Kitov PI, Bundle DR and Klassen JS. The observation of multivalent complexes of Shiga-like toxin with globotriaoside and the determination of their stoichiometry by nanoelectrospray Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Glycobiology* 2001; 11: 605-11.
- Kitova EN, Kitov PI, Paszkiewicz E, Kim J, Mulvey GL, Armstrong GD, Bundle DR and Klassen JS. Affinities of Shiga toxins 1 and 2 for univalent and oligovalent Pk-trisaccharide analogs measured by electrospray ionization mass spectrometry. *Glycobiology* 2007; 17: 1127-37.
- Kurmanova A, Llorente A, Polesskaya A, Garred Ø, Olsnes S, Kozlov J and Sandvig K. Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 144-9.

- Lea N, Lord M and Roberts LM. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology* 1999; 145: 999-1004.
- Leverly SB, Toledo MS, Doong RL, Straus AH and Takahashi HK. Comparative analysis of ceramide structural modification found in fungal cerebrosides by electrospray tandem mass spectrometry with low energy collision-induced dissociation of Li⁺ adduct ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 551-63.
- Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H and Wachsmuth K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987; 156: 175-82.
- Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL and Read RJ. Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb₃. *Biochemistry* 1998; 37: 1777-88.
- Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* 1996; 4: 147-53.
- Lingwood CA. Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* 1994; 66: 21-8.
- Loboda AV, Ackloo S and Chernushevich IV. A high-performance matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometer with collisional cooling. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 2508-16.
- Louise CB and Obrig, TG. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis* 1995; 172: 1397-401.

- Lu Y, Iyoda S, Satou H, Satou H, Itoh K, Saitoh T and Watanabe H. A new immunoglobulin-binding protein, EibG, is responsible for the chain-like adhesion phenotype of locus of enterocyte effacement-negative, shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2006; 74: 5747-55.
- Macher BA and Klock JC. Isolation and chemical characterization of neutral glycosphingolipids of human neutrophils. *J Biol Chem* 1980; 255: 2092-6.
- McSweeney LA and Dreyfus LA. Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. *Infect Immun* 2005; 73: 2051-60.
- Meisen I, Friedrich AW, Karch H, Witting U, Peter-Katalinić J and Müthing J. Application of combined high-performance thin-layer chromatography immunostaining and nanoelectrospray ionisation quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry to the structural characterization of high- and low-affinity binding ligands of Shiga toxin 1. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 3659-65.
- Merritt EA and Hol WGJ. AB₅ toxins. *Curr. Opin. Struct Biol* 1995; 5: 165-71.
- Mise K, Akifusa S, Watarai S, Ansai T, Nishihara T and Takehara T. Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 2005; 73: 4846-52.
- Miura Y, Sakaki A, Kamihira M, Iijima S and Kobayashi K. A globotriaosylceramide (Gb3Cer) mimic peptide isolated from phage display library expressed strong neutralization to Shiga toxins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 883-9.

- Miyamoto Y, Iimura M, Kaper JB, Torres AG and Kagnoff MF. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. *Cell Microbiol* 2006; 8: 869-79.
- Müsken A, Bielaszewska M, Greune L, Schweppe CH, Müthing J, Schmidt H, Schmidt MA, Karch H and Zhang W. Anaerobic conditions promote the expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1087-93.
- Müthing J, Duvar S, Heitmann D, Hanisch FG, Neumann U, Lochnit G, Geyer R and Peter- Katalinic J. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vitro* propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiology* 1999; 9: 459-68.
- Müthing J, Meisen I, Bulau P, Langer M, Witthohn K, Lentzen H, Neumann U, Peter-Katalinić J. Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues. *Biochemistry* 2004; 43: 2996-3007.
- Müthing J, Schweppe CH, Karch H and Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost* 2009; 101: 252-64.
- Nakajima H, Katagiri YU, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Saito M, Nakao H, Takeda T and Fujimoto J. Single-step method for purification of Shiga toxin-1 B subunit using receptor-mediated affinity chromatography by globotriaosylceramide-conjugated octyl sepharose CL-4B. *Protein Expr Purif* 2001; 22: 267-75.
- Nesic D, Hsu Y and Stebbins CE. Assembly and function of a bacterial genotoxin.. *Nature* 2004; 429: 429-33.

- O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR and Formal SB. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli. *J Infect Dis* 1982; 146: 763-9.
- O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW and Formal SB. Escherichia coli O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* 1983; 1: 702.
- Obrig TG, Del Vecchio PJ, Brown JE, Moran TP, Rowland BM, Judge TK and Rothman SW. Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 1988; 56: 2373-8.
- Ohmi K, Kiyokawa N, Takeda T and Fujimoto J. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 137-41.
- Paton JC and Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-79.
- Paton JC, Paton AW. Shiga toxin 'goes retro' in human primary kidney cells. *Kidney Int* 2006; 70: 2049-51.
- Pick J. Einige Vitalfärbungen am Frosch mit neuen fluoreszierenden Farbstoffen. *Z wiss Mikr* 1935; 51: 338-51.
- Pohlenz JF, Winter KR and Dean-Nystrom EA. Shiga-toxigenic Escherichia coli-inoculated neonatal piglets develop kidney lesions that are comparable to those in humans with hemolytic-uremic syndrome. *Infect Immun* 2005; 73: 612-6.
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K and Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease. *Nature* 1987; 325: 458-62.

- Ren J, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y and Miyatake T. Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res* 1999; 825: 183-8.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N Engl J Med* 1983; 308: 681-5.
- Römer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegl B, Tenza D, Aly MR, Fraisier V, Florent JC, Perrais D, Lamaze C, Raposo G, Steinem C, Sens P, Bassereau P and Johannes L. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 2007; 450: 670-5.
- Sandt CH and Hill CW. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin- binding activities within a single strain of Escherichia coli. *Infect Immun* 2000; 68: 2205-14.
- Sandt CH and Hill CW. Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of Escherichia coli. *Infect Immun* 2001; 69: 7293-303.
- Sandvig K and van Deurs B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther* 2005; 12: 865-72.
- Sandvig K, Ryd M, Garred O, Schweda E, Holm PK and van Deurs B. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol* 1994; 126: 53-64.

- Satomi D and Kishimoto Y. Change of galactolipids and metabolism of fatty acids in the organotypic culture of myelinating mouse brain. *Biochim Biophys Acta* 1981; 666: 446-54.
- Schiller J, Süß R, Fuchs B, Müller M, Petković M, Zschörnig O and Waschipky H. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *Eur Biophys J* 2007; 36: 517-27.
- Schlegel HG, and Zaborosch C. Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York. 1992
- Schmidt H, Kernbach C and Karch H. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:h7. *Microbiology* 1996; 142: 907-14.
- Schüller S, Frankel G and Phillips AD. Interaction of Shiga toxin from Escherichia coli with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. *Cell Microbiol* 2004; 6: 289-301.
- Schweppe CH, Bielaszewska M, Pohlentz G, Friedrich AW, Büntemeyer H, Schmidt MA, Kim KS, Peter-Katalinić J, Karch H and Müthing J. Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity. *Glycoconj J* 2008; 25: 291-304.
- Senn HJ, Orth M, Fitzke E, Wieland H and Gerok W. Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur J Biochem* 1989; 181: 657-62.

- Shenker BJ, Dlakic M, Walker LP, Besack D, Jaffe E, LaBelle E and Boesze-Battaglia K. A novel mode of action for a microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity. *J Immunol* 2007; 178: 5099-108.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68: 850-8.
- Shiga K. Über den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung I.* 1898; 24: 817-28.
- Skipski VP. Thin-layer chromatography of neutral glycosphingolipids. *Methods Enzymol* 1975; 35: 396-425.
- Smith DC, Sillence DJ, Falguières T, Jarvis RM, Johannes L, Lord JM, Platt FM and Roberts LM. The association of Shiga-like toxin with detergent-resistant membranes is modulated by glucosylceramide and is an essential requirement in the endoplasmic reticulum for a cytotoxic effect. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1375-87.
- Stins MF, Gilles F and Kim KS. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 1997; 76: 81-90.
- Stricklett PK, Hughes AK, Ergonul Z and Kohan DE. Molecular basis for up-regulation by inflammatory cytokines of Shiga toxin 1 cytotoxicity and globotriaosylceramide expression. *J Infect Dis* 2002; 186: 976-82.

- te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyers F, Demacker PN, van Den Heuvel LP and van Hinsbergh VW. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2000; 95: 3396- 402.
- Tomasi M, Roda LG, Ausiello C, D'Agnolo G, Venerando B, Ghidoni R, Sonnino S and Tettamanti G. Interaction of GMI ganglioside with bovine serum albumin: formation and isolation of multiple complexes. *Eur J Biochem* 1980; 111: 315-24.
- Tozzi AE, Caprioli A, Minelli F, Gianviti A, De Petris L, Edefonti A, Montini G, Ferretti A, De Palo T, Gaido M, Rizzoni G; Hemolytic Uremic Syndrome Study Group. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 106-8.
- van Ulsen P and Tommassen J. Protein secretion and secreted proteins in pathogenic Neisseriaceae. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 292-319.
- Venerando B, Roberti S, Sonnino S, Fiorilli A and Tettamanti G. Interactions of ganglioside GM1 with human and fetal calf sera. Formation of ganglioside-serum albumin complexes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 692: 18-26.
- Welch RA and Pellett S. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J Bacteriol* 1988; 170: 1622-30.
- White T, Bursten S, Federighi D, Lewis RA and Nudelman E. High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 1998; 258: 109- 17.
- WHO. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet No. 125. 2005.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 14.04.1980
Geburtsort: Herford
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Vater: Hans Gerhardt Schweppe, Bankkaufmann
Mutter: Annegret Schweppe, geb. Kemena, Familienpflegerin

Beruflicher Werdegang

10.2005 – 07.2009 Promotionsstudium der Naturwissenschaften als externe Arbeit der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld

Institut für Hygiene
Universitätsklinikum Münster
Robert-Koch-Straße 41, 48149 Münster

Thema der Dissertation:
Rezeptor-Ligand-Interaktionen von Toxinen aus pathogenen *Escherichia coli* Bakterien.
Voraussichtlicher Abschluss: Dr. rer. Nat.

10.2000 – 09.2005 Studium der Molekularen Biotechnologie

Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld

Thema der Abschlussarbeit:
Immunochemische und massenspektrometrische Charakterisierung von neutralen GSL mit Shigatoxin-Rezeptorfunktion aus humanen Erythrozyten, Endothelzellen und Lipoproteinen
Abschluss: Dipl. Biotech.

09.1999 – 06.2000 Zivildienst

Umweltamt der Stadt Bad Oeynhausen
Schwarzer Weg 6, 32549 Bad Oeynhausen

Schulbildung

09.1990 – 06.1999 Städtisches Gymnasium Löhne, Albert-Schweizer Straße 16, 32584 Löhne
Abschluss: Abitur (Note: 1,5)

09.1987 – 07.1990 Grundschule Gohfeld, Goethestr. 25, 32584 Löhne

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift