

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

Zeitraum: 06.07.- 31.07.2009

Betreuer: Dr. Joachim Orth
Björn Schorch

Verfasser: Werner Hentschel

Bericht über das IBO-Praktikum zum

Thema:

***Pasteurella multocida* toxin**

Gliederung

1 Einleitung	2
2 Projektinformationen	4
3 Material und Methoden	9
4 Nähere Themenbetrachtung.....	15
5 Fazit/Rückblick.....	18
6 Quellenverzeichnis	20
7 Anhang	21

1 Einleitung

Geboren am 15.10.1991 in Magdeburg, werde ich am dortigen Gymnasium „Werner-von-Siemens“ mit mathematisch-naturwissenschaftlich-technischem Schwerpunkt voraussichtlich 2010 das Abitur ablegen. Bis dato absolvierte ich zwei Praktika an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, am Institut für Apparate- und Umwelttechnik, sowie am Chemischen Institut, nahm an verschiedenen Korrespondenzzirkeln (Mathematik, Biologie, Chemie) und Wettbewerben teil. Zu nennen wären zum Beispiel der Biologie- respektive Chemiemannschaftswettbewerb der Spezialschulen, „Chemie – die stimmt“ und die Internationale Biologie- beziehungsweise Chemie-Olympiade. Die Wahl der Schule und die außerschulischen Aktivitäten weisen auf mein besonderes Interesse an Naturwissenschaften und meine Bereitschaft zur vielseitigen Weiterbildung hin. So ist meine Motivation zu diesem Praktikum entstanden. Da meine Neugier bisher eher auf die Chemie gerichtet war, konnte ich bisher noch keine Vorkenntnisse auf dem Gebiet der Toxikologie oder der Biochemie der Signaltransduktion vorweisen. Jedoch war es mir möglich, bei oben erwähnten Wettbewerben und Praktika bereits ein wenig Erfahrung in der Laborarbeit zu sammeln. Das vom Förderverein der Biologieolympiade angebotene Praktikum findet am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg statt. Dieses beschäftigt sich mit dem im Namen enthaltenen wissenschaftlichen Disziplinen. Dort werden die Wechselwirkungen zwischen körperfremden Stoffen (Pharmaka) und Organismen (biologischen Systemen) untersucht. Aus den Untersuchungen können dann Schlussfolgerungen für die Anwendung am kranken Organismus zu therapeutischen Zwecken (Pharmakotherapie) oder zur Erkennung, Behandlung und Verhütung von Vergiftungen (Toxikologie) gezogen werden¹. Die Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Dr. Dr. Aktories, durch Dr. Joachim Orth betreut, in deren Arbeit ich einen Einblick erhalten durfte, beschäftigt sich mit der Wirkung, insbesondere mit den Wegen der Signaltransduktion, des Toxins von *Pasteurella multocida* (PMT) und anderen bakteriellen Proteintoxinen.

Wie bereits erwähnt, wurde ich direkt in die laufenden Forschungsarbeiten eingegliedert, sodass ich kein eigenes Projekt bearbeiten und hier beschreiben kann. Auch wäre der Zeitraum von nur vier Wochen für die Durchführung eines eigenen Projektes respektive dem ebenfalls erforderlichen Anlernen der dazu benötigten Fertigkeiten und Methoden nicht ausreichend. Aus diesem Grund werde ich einige laufende Projekte kurz beschreiben, wobei ich allerdings wiederum nicht auf eigene Ergebnisse eingehen kann, da ich nur stark

¹Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Frankfurt, Oxford, 1997

partiell in die jeweiligen Arbeiten einbezogen werden konnte. Deswegen möchte ich statt den im „Leitfaden zum Praktikumsbericht“ vorgeschlagenen Punkten „4 Versuchsergebnisse“ und „5 Diskussion“ die bisherigen Erkenntnisse zu PMT zusammenfassend darstellen. Außerdem möchte ich bereits im Anschluss der Beschreibung einer jeweiligen Methode erstens den theoretischen Hintergrund an schwierigen Stellen umgehend aufklären und zweitens den forschungsrelevanten Nutzen kurz benennen.

Die wichtigsten Erkenntnisse für mich sind die Einblicke in den Labor- und Forschungsalltag, wobei ich selbstverständlich auch Wissen über die Forschungsinhalte der AG Aktories/Orth und, dank Arbeitsgruppenseminaren, auch anderer AGs des Instituts erhielt.



Abb.1: Haus des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie;
<http://www.pharmakologie.uni-freiburg.de/>

2 Projektinformationen

Da wir die Wirkungsweise und Signaltransduktion bakterieller Toxine untersuchten, lässt sich das Forschungsthema der AG Aktories/Orth am besten in die Toxikologie oder die Biochemie der Signaltransduktion einordnen. Neben einer kurzen Einführung zu Bakteri-entoxinen möchte ich außerdem auf die so genannten heterotrimeren G-Proteine eingehen. Diese stellen das Hauptangriffsziel des PMT (*Pastorella multocida*-Toxin) dar.

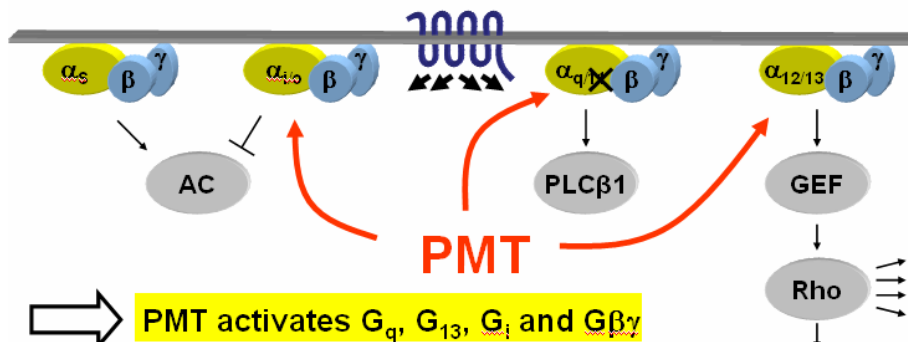


Abb.2: Ziele des PMT; Inga Preuß und Joachim Orth: Activation of heterotrimeric G proteins by *Pasteurella multocida* toxin, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2009 (Powerpoint-Präsentation), Folie 2

Zunächst zu den G-Proteinen: Ihren Namen verdanken sie der wichtigen Rolle des GTP (Guanosintriphosphat) bei ihrer Aktivierung. Mitglieder, darunter fällt zum Beispiel auch das dem Rhodopsin zugeordnete Transducin (G_t), dieser Proteinfamilie sind unter anderem beteiligt an der Signaltransduktion an Membranen, der Lichtwahrnehmung, dem Geruchs- und Geschmacksempfinden (süß, bitter) und der Kontrolle von Differenzierung und Zellteilung. Dieses breite Wirkungsspektrum lässt auf eine Vielgestaltigkeit der einzelnen Vertreter der Familie der G-Proteine schließen, und tatsächlich werden als grobe Einteilung bereits vier Subfamilien unterschieden (s. Tabelle 1 im Anhang). Dabei dienen die Hemmbarkeit durch Pertussis-Toxin (G_i) oder das Cholera-Toxin (G_s) beziehungsweise die Unempfindlichkeit gegen diese Toxine (G_q), sowie die Aktivierung durch bestimmte Rezeptoren (bei G_{12} Thromboxan-/Thrombin-Rezeptoren), zur Charakterisierung der einzelnen Subfamilien. Allgemein kann man die G-Proteine in die Superfamilie der regulatorischen GTPasen einordnen, wo etwa auch die kleineren Ras-Proteine zu finden sind. Diese sind durch eine GTP-vermittelte Schalterfunktion bestimmt. In Abb.1 ist der Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus solcher regulatorischen GTPasen schematisch dargestellt. Liegt die GTPase in der GDP gebundenen Form vor, so ist es inaktiv und übt keinen weiteren Einfluss auf nachgeschaltete Effektormoleküle aus. Durch aktivierende Moleküle, auch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factor, GEF) genannt, wird

die Dissoziation des GDP initiiert, wodurch das in der Zelle im hohen Überschuss vorliegende GTP an die entsprechende Bindungsstellen des G-Proteins binden und dieses so in den aktivierten Zustand versetzen kann. Das aktivierte G-Protein kann nun auf die ihm nachgeschalteten Effektormoleküle einwirken und somit das durch den GEF verarbeitete Signal weiterleiten. Durch seine intrinsische GTPase-Aktivität versetzt sich das G-Protein mittels hydrolytischen Abbau des GTP zum GDP selbst wieder in den inaktiven Zustand, wodurch die Signalleitung von neuem von statten gehen kann. Wie in Abb. 1 zu sehen, kann der Funktionszyklus der regulatorischen GTPasen an verschiedenen Stellen beeinflusst werden. So genannte GAPs (GTPase aktivierende Proteine) stimulieren die GTPase-Tätigkeit, wodurch die G-Proteine schneller wieder in ihren inaktiven Zustand überwechseln, die Signalübertragung schneller beendet wird. Außerdem gibt es Moleküle, die als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) bezeichnet werden und die Aktivierung der regulatorischen GTPase, somit die Signalübertragung, durch Blockierung/Verhinderung der GDP-Dissoziation verhindern.

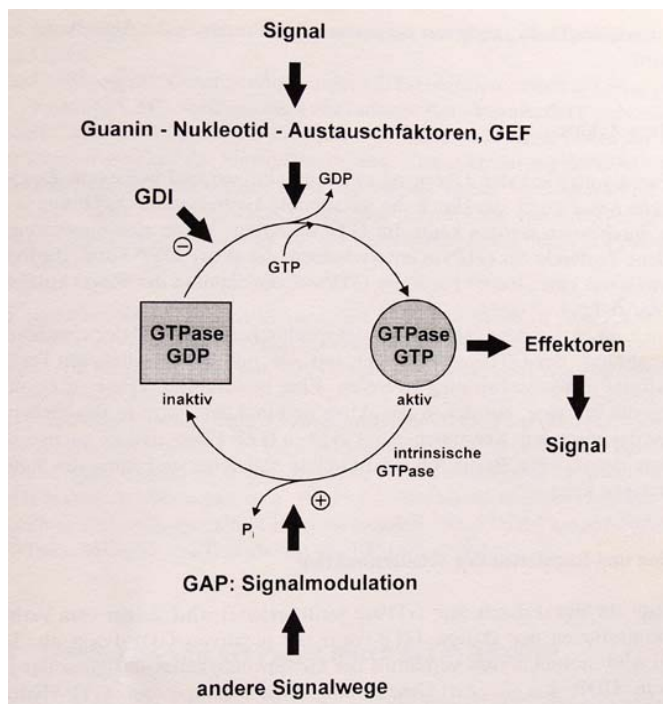


Abb.3: Funktionszyklus regulatorischer GTPasen, Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997, Seite 195

Die heterotrimeren G-Proteine unterliegen als regulatorische GTPasen natürlich auch diesem allgemeinen Funktionszyklus, jedoch sei im Folgenden auf die Besonderheiten hingewiesen. Die Funktion des GAP übernehmen bei den G-Proteinen 7-Helix-Transmembranrezeptoren, die wegen der Reaktionsspezifität zwischen ihnen und den G-Proteinen auch als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-proteine-coupled receptor, GPCR) bezeichnet werden. Diese membranassoziierten Rezeptoren werden durch extrazelluläre Signale, wie Licht, Geruchs- oder Geschmackstoffe oder Hormone (Adrenalin, Glu-

cagon), angeregt. Dann führen sie in ihrem cytosolischen Teil eine Konformationsänderung durch, die wiederum zu einer erhöhten Affinität gegenüber den im inaktivem Zustand ebenfalls heterotrimeren G-Proteinen führt. Diese bestehen aus drei unterschiedlichen Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$), wobei die α -Untereinheit am größten und membranassoziiert ist, sowie neben der Rezeptorbindungsdomäne auch die intrinsische GTPase-Domäne enthält; sie wird im folgendem mit G_α abgekürzt. Die β - und γ -Untereinheit sind hingegen kleiner und unter nativen Bedingungen miteinander verbunden, bilden also einen $\beta\gamma$ -Komplex. Im inaktiven Zustand des G-Proteins ist dieser Komplex mit G_α durch Bindung über die β -Untereinheit verbunden. Dem $\beta\gamma$ -Komplex sind auch eine eigene regulatorische Funktion und eigene Rezeptormoleküle zuzuordnen.

Doch zurück zum eigentlichen Funktionszyklus: Die Bindung des $G_{\alpha\beta\gamma}$ -Komplexes an den aktivierten Rezeptor (R^*) bewirkt die Dissoziation des gebundenen GDP. Die aktivierende Bindung von GTP an G_α führt dann zur Abspaltung des $\beta\gamma$ -Komplexes, sowie zum Abtrennen des G_α von R^* , womit G_α das Einwirken auf seine Effektormoleküle (z. B. Adenylat-Cyclase) ermöglicht wird. Nach der GTP-Hydrolyse steigt die Bindungsaffinität des G_α zum $\beta\gamma$ -Komplex und nach der Bindung an diesen ist der inaktive Grundzustand des heterotrimeren G-Proteins wiederhergestellt, wobei G_α und die γ -Untereinheit durch entsprechende Verankerungen für die Membranassoziation sorgen.

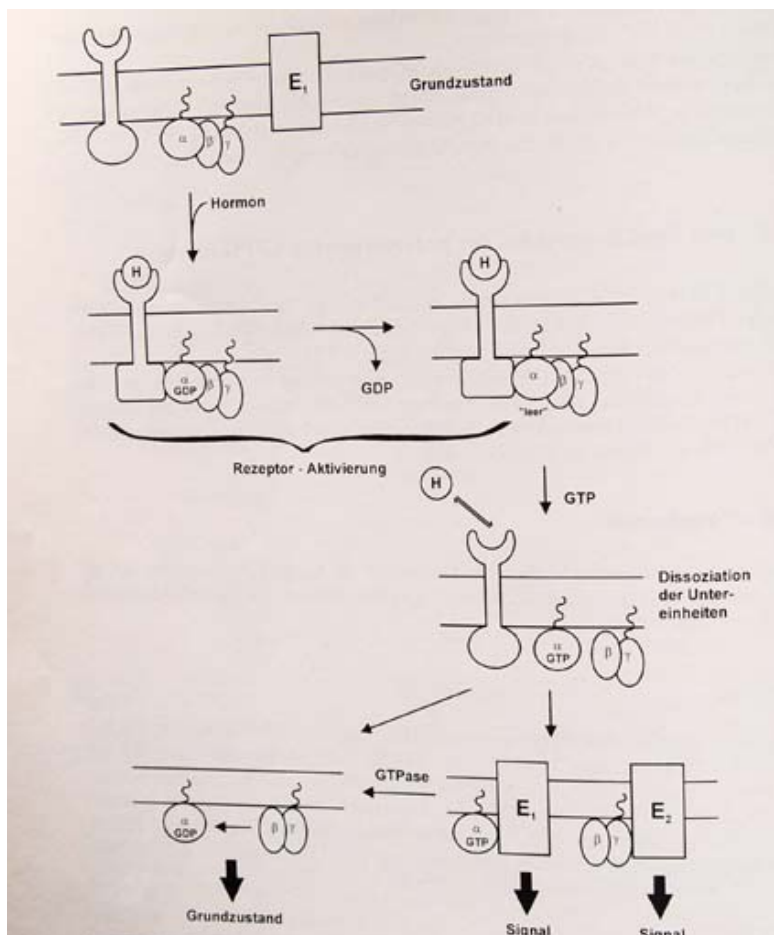


Abb.4: G-Protein-Zyklus, Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997, Seite 206

Bakterientoxine werden historisch bedingt in Endo- und Exotoxine unterschieden. Während Endotoxine nur von in Lyse oder Apoptose befindlichen Bakterien freigesetzt werden, bilden Exotoxine die Toxine im eigentlichen Sinne, sie werden endocytiert, bilden Poren durch Zusammenlagerung mehrerer Toxinmoleküle oder durch Membranschädigungen. Während sich Endotoxine vom Aufbau grundsätzlich analog zusammensetzen, es sind chemisch betrachtet Liposaccharide, variiert die Gestalt der Exotoxine sowohl vom Aufbau, als auch vom chemischen Charakter sehr stark, meist sind es allerdings Proteinkomplexe unterschiedlicher Größe.

Endotoxine aktivieren bereits in sehr geringen Konzentrationen Zellen des Immunsystems, hauptsächlich Monocyten und Makrophagen, und induzieren so die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren durch diese Zellen. Diese sorgen wiederum für die vielfältigen biologischen Wirkungen der Endotoxine. Geringe Endotoxinkonzentrationen können durchaus zur sinnvollen Aktivierung von Abwehrmechanismen führen, jedoch kommt es bei hohen Endotoxinkonzentrationen zur übermäßig starken Produktion von Cytokinen und Entzündungsmediatoren. Was dann letztendlich zu Organschädigungen und zum septischen Schock führen kann.

PMT allerdings ist ein Exotoxin. Die Wirkmechanismen von Exotoxinen variieren stark. Da PMT auf heterotrimere G-Proteine wirkt, seien hier zuvor zwei weitere Toxine (Cholera-Toxin, Pertussis-Toxin) vorgestellt, die ebenfalls auf heterotrimere G-Proteine einwirken. Außerdem soll kurz auf CNF (cytotoxisch nekrotisierender Faktor von *E. coli*) eingegangen werden, da dieses einen zum PMT identisch Wirkmechanismus (Deamidierung) aufweist.

Cholera-Toxin wird von *Vibrio cholerae* produziert und ist der entscheidende Viruenzfaktor bei der Cholera. Es ADP-ribosyliert die α -Untereinheit von G_s -Proteinen und blockiert hierdurch deren GTPase-Aktivität, wodurch diese persistierend aktiv bleiben.

Bordetella pertussis, der Erreger des Keuchhustens, produziert das Pertussis-Toxin. Dieses ADP-ribosyliert die α -Untereinheit von nicht dissoziierten $G\alpha_i$ -Proteinen und verhindert so die Interaktion der α -Untereinheit mit dem Rezeptor. Es hemmt also die Aktivierung der G-Proteine.

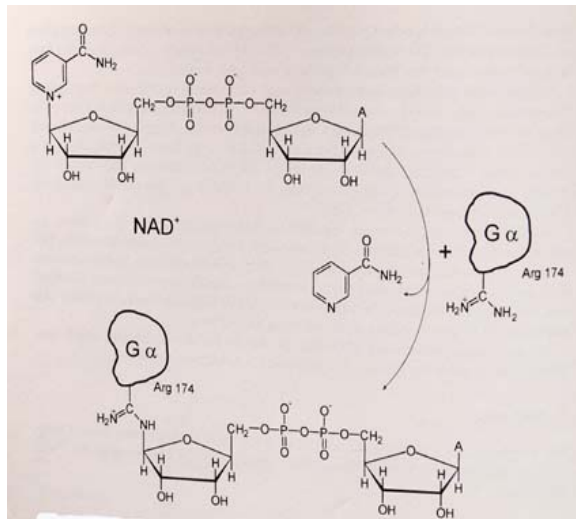


Abb.5: ADP-Ribosylierungsmechanismus, Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997, Seite 204

CNF, der cytotoxische nekrotisierende Faktor, wird von vielen pathogenen *E. coli*-Stämmen exprimiert. Bei einer Toxininjektion in die Haut bilden sich Nekrosen. CNF wirkt, wie PMT, als Deamidase und spaltet selektiv die γ -Amid-Gruppe eines, für die GTP-Hydrolase essentiellen, Glutamins im Rho-Molekül ab (PMT wirkt analog bei entsprechenden G-Proteinen). Dies führt, wie beim Cholera-Toxin, zu einer persistierenden Aktivierung des Substratproteins, der Rho-GTPase.²

² abgewandelt zitiert nach: Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10.Auflage, Urban & Fischer Verlag der Elsevier GmbH, München 2009

3 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden einige Arbeitstechniken zusammenhängend an einem Arbeitsvorgang erklärt.

PCR/Quickchange

Das Ziel der Polymerase-Kettenreaktion ist es, in kurzer Zeit und wenig Aufwand möglichst oft eine bestimmte Sequenz der DNS aus kurzen Startsequenzen, den Primern, zu generieren. Der Mechanismus ist folgender: Durch Erhitzen auf 96°C wird die Ausgangs-Doppelstrang-DNS denaturiert und in ihre Einzelstränge aufgespaltet. Anschließend wird wieder auf eine primerspezifische Temperatur heruntergekühlt, damit sich die Primer an den entsprechend komplementären Einzelstrangabschnitten anlagern (Annealing) können. Die jeweilige hitzestabile Polymerase beginnt nun, nach Erreichen der wiederum höheren polymerasespezifische Temperatur, hinter den Primersequenzen aus den vorgelegten dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate), einen komplementären Einzelstrang zu erzeugen, sodass am Ende dieser Phase wieder eine Doppelstrang-DNS vorliegt. Im nächsten Zyklus werden die nun vorhandenen Doppelstränge wieder gespalten und die eben beschriebene Prozedur beginnt von neuem. Ab dem vierten Zyklus ist das Anwachsen der Stranganzahl exponentiell.

Als eigentliche Arbeitsschritte verbleiben bei heutigen „Thermocyclern“, Maschinen die die oben beschriebenen thermischen Zyklen in angegebener Zeit und Häufigkeit automatisch realisieren, nur noch die Herstellung der Primer, das Zusammenführen der nötigen Substanzen (Polymerase, dNTPs, Wasser), das Entwerfen und Eingeben des PCR-Protokolls und das Hineinstellen des Eppis mit dem Substanzenmix, sowie das Starten der PCR-Prozedur.

Die Quickchange ist eine besondere Form der PCR, bei der kleinste Mutationen von einzelnen Codons der Ausgangs-DNS vorgenommen werden. Dazu werden Primer verwendet, die bereits die gewünschten Mutationen enthalten und außerdem weitere, als Schnittstellen bezeichnete, Sequenzabschnitte aufweisen. Nach der PCR liegen aber nicht nur die gewünschten modifizierten DNS-Stränge vor, sondern auch Ausgangs-DNS vor. Letztere wurde in Modellorganismen, wie *E. coli* generiert und weist so Methylierungen auf. Bestimmte Enzyme (z.B. DpnI) erkennen solche Methylierungen und zersetzen die methylierte DNS. Da DNS erst in Organismen zum Zwecke des „Ein-“ beziehungsweise „Ausschaltens“ bestimmter Gene methyliert wird, weist die aus den Primern generierte Ziel-DNS

keine Methylierung auf, wird somit nicht von den Verdau-Enzymen zersetzt. Somit sollte nach dem Verdau das reine Produkt mit Mutationen vorliegen.

Transfektionen

Im Allgemeinen sind nicht bestimmte DNS-Sequenzen das Endziel eines Arbeitsvorgangs, sondern diese dienen nur dazu, entsprechend modifizierte Proteine in entsprechenden Zellen zu exprimieren, um mit diesen modifizierten Proteinen weitergehende Versuche durchzuführen. Damit die jeweiligen Zellen in der Lage sind die gewünschten Proteine zu produzieren, müssen die nötigen DNS-Sequenzen, hier in Form von Plasmiden, in sie eingeschleust werden; die Zellen müssen transfiziert werden. Dazu seien hier zwei Formen der Transfektion eukaryoter Zellen kurz erläutert.

Lipofektion (PEI-Transfektion)

Bei dieser Methode wird der Plasmid von Lipiden in Form eines Bläschens umhüllt und so in die Zelle geschleust. In der Zelle löst sich das Liposom auf und die freigegebenen Plasmiden werden auf hier nicht zu erläuternden Mechanismen in den Zellkern gelangen und dort schließlich in die Organismen-DNS eingebaut.

Versuchsbeschreibung:

Man beginnt mit dem ansetzen des Transfektionsansatzes und gibt dazu 500 µl Opti-MEM (Medium), 6 µg DNS und 25 µl PEI (Polyethylenimin) in ein entsprechendes Gefäß (1,5 ml-Eppi). Diese Mischung, für eine 10 cm-Schale kalkuliert, vortext man nun schwach und lässt sie 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. „Vortexen“ ist Laborjargon und steht für das Mischen eine Probe via Vortex-Rüttelplatte. Das Gemisch wird dann tropfenweise auf die Zellen, beispielsweise HEK-Zellen (humane embryonic kidney cells), gegeben und nach fünf bis sechs Stunden Inkubationszeit wieder durch Medium ausgetauscht.

Das Arbeitprotokoll ist im Anhang zu finden.

Elektroporation (Amxa-Transfektion)

Diese Methode ist etwas rabiater als die vorige, ist aber bei bestimmten Zellstämmen unerlässlich beziehungsweise eine Alternative zu der Lipofektion. Die Prozedur lässt sich folgendermaßen umreißen: Die Zellmembranen der Zellen werden durch einen genügend starken Elektroschock, schlagartig erweitert. In diesem Zustand ziehen die Zellen alles aus ihrer Umgebung in ihr Cytosol. Wie zu erwarten stirbt bei dieser Methode ein Großteil der Zellen, etwa 50 %, bei den Überlebenden ist dafür die Transfektionsrate sehr hoch (~90%).

Versuchsbeschreibung:

Zu Beginn erntet man die Zellen, indem man zunächst eine mittlere Stammflasche (ca. 15 ml), nach Entfernen des alten Mediums mit 5 ml PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung) wäscht, dieses wieder absaugt und die Zellen dann mit einer Lösung bestehend aus 7 ml Medium und 3 ml Trypsin vom Boden der Stammflasche löst. Der Inhalt der Stammflasche wird nun (samt Zellen) in ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführt. Um eine Kalkulation über das benötigte Volumen dieser Zellsuspension anstellen zu können, schließlich werden etwa zwei Millionen Zellen pro Transfektionsansatz benötigt und auch verwendet, müssen die Zellen zunächst gezählt werden. Dazu verwendet man eine Neugebauer-Zählkammer. Zunächst gibt man genügend der Zellsuspension in die entsprechende Öffnung der Zählkammer, sodass sich eine die gesamte Zählfläche bedeckende Schicht bildet. Auf der Zählfläche ist nun ein mikroskopisches Muster in Form vieler kleiner Planquadrate, die wiederum ein größeres Quadrat bilden, aufgebracht. Dann wird je nach gezählten Zellen die Konzentration der Zellen in der Suspension berechnet, dabei entsprechen 160 Zellen im Quadrat 1,6 Millionen Zellen pro Milliliter Suspension. Das entsprechend benötigte Volumen an Zellsuspension wird in ein neues 15 ml-Falcon-Gefäß überführt und bei 800 rpm (Umdrehungen pro Minute) für drei Minuten zentrifugiert. Den Überstand entfernt man komplett mit einer Pipette und das Zellpellet wird mit 100 µl Amaxa-Reagenz und 10 µg aufgereinigter Plasmid-DNS resuspendiert, wobei darauf zu achten ist, dass das Volumen der DNS-Lösung nicht mehr als 10 µl beträgt. Nun werden die Zellen in die Elektroporationsküvette überführt und alte Falcons mit 6 ml Medium befüllt. Anschließend wählt man das entsprechende Programm an der Amaxa-Maschine (bei MEF-Zellen [murine embryonic fibroblastic cells] A33) und führt die Elektroporation durch. Darauf folgend füllt man eine mitgelieferte Plastikpipette mit Medium und gibt dieses zu den elektroporierten Zellen, von denen gut die Hälfte starben und nun einen unerwünschten Schleim bilden, der beim zufügen vom Medium nach oben getrieben wird. Um diesen Effekt abzusichern sollte man das Medium entsprechend kräftig in die Küvette einspritzen. Nun wird wieder alles bis auf den Schleim aus der Küvette gesaugt und die so gewonnenen Zellen werden auf einer neuen Platte ausgesetzt, um sich zu erholen, und mit frischem Medium versorgt, damit sie den Stress des Elektroschocks gut überwinden und die Ziel-DNS in ihr Genom einbauen können, um schließlich das gewünschte Zielprotein, beispielsweise eine Mutante des PMT, zu exprimieren.

Das entsprechende Protokoll ist wiederum im Anhang zu finden.

GST-Fusionsproteinaufreinigung

Die oben beschriebenen Transfektionen werden bei eukaryoten Zellen angewendet, sodass diese dann das Zielprotein selbst exprimieren. Dieser Weg der Untersuchung der Wirkung eines Proteins ist allerdings sehr aufwendig und muss für jede neue Zellsorte erneut durchgeführt werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass modifizierte Varianten des Zielproteins direkt in der Zelle getestet werden können und eventuelle Schwierigkeiten bezüglich der Aufnahme des Zielproteins durch die Zelle werden umgangen. Um die Wirkung eines bestimmten Proteins jedoch sicher zu klären sind sehr viele Versuche notwendig. Um den Versuchsaufwand einer solchen Untersuchungsreihe möglichst gering zu halten, wählt man meist einen anderen Weg Versuchszellen dem Zielprotein/ -toxin auszusetzen. Man lässt sie dieses nicht selbst herstellen, sondern setzt die Substanz einer unbehandelten Zellkultur zu. Hierfür sind aufgrund der Mannigfaltigkeit und Anzahl der Versuche, die notwendig sind um beispielsweise den Wirkmechanismus eines Toxins aufzuklären, große Mengen des Toxins und seiner zur Untersuchung notwendigen modifizierten Varianten vonnöten. Um diese Mengen herzustellen, werden beispielsweise *E. coli* durch entsprechende Verfahren mit das Zielprotein codierenden Plasmiden transfiziert. Nachdem sich die transfizierten Zellen in Kultur erholen und vermehren konnten, haben sie auch das erwünschte Zielprotein exprimiert, sodass dieses nun aus ihrem Cytosol zu gewinnen ist. Dazu werden die Zellen zunächst durch verschiedene Methoden (Einsatz von Detergenzien, Ultraschall, Scherkräfte) aufgeschlossen und anschließend das, an spezielle Proteine (GST, Glutathion-S-Transferase) gebundene Zielprotein aus dem Zelllysat gefiltert. Die erwähnten an dem Zielprotein gebundenen Proteine binden an bestimmte Filter (Glutathion-Sepharose).

Arbeitsbeschreibung:

Die erfolgreich transfizierten Zellen müssen nun entsprechend vervielfältigt werden, um eine befriedigende Ausbeute an Zielprotein zu haben. Dazu wird zunächst eine Vorkultur dieser Zellen angelegt, indem pro gewünschten Liter Endkultur 50 ml mit Ampicillin versetztes LB-Medium (LB_{Amp}) mit den gewünschten Zellen (*E. coli*) animpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt werden. Die transfizierte DNS-Sequenz enthält ein Gen, das Proteine codiert die zu einer Ampicillin-Resistenz führen. Nicht transfizierte Zellen sterben aber an diesem Antibiotikum, sodass eine Selektion zwischen diesen und den erwünschten transfizierten Zellen erfolgt. Jede 50 ml-Vorkultur wird nun in 1 Liter LB_{Amp} überführt und diese Kultur dann bei 37°C geschüttelt bis die optische Dichte der Kultur bei einer Messwellenlänge von 600 nm größer eins ist. Nun setzt man der Kultur pro Liter 500 µl 1-molares

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zu. Dieses sorgt für die Aktivierung einer bisher von einem (Lac-)Repressor unterdrückten Genabschnitt (z.B. der das Zielprotein codierende). Anschließend lässt man die Kultur bei 29°C 20 Stunden oder über Nacht schütteln. Die Zellernte erfolgt dann via 15-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm in entsprechenden Zentrifugationsgefäßen mit einer geeigneten Zentrifuge. Hiernach folgt die Lyse der Zellen in drei Schritten. Zunächst wird das Zellpellet mit 15 ml Lysispuffer resuspendiert. Um die Zellmembranen weiter aufzubrechen wird nun dreimal 30 Sekunden lang mit einer jeweils einminütigen Pause bei jeweiligen maschinenabhängigen Einstellungen (hier Cycle: 70 und Power: 50%) mit Ultraschall behandelt. Zuletzt werden die Zellen noch einmal mittels Scherkräften aufgebrochen. Hier am Institut realisiert man das mit einer „French Press“ genannten Maschine, die nichts anderes tut als eine Suspension mittels eines Kolbens in einem Zylinder durch ein sehr enges Rohr bei hohem Druck zu pressen. Die Zelllysate werden mit einer geeigneten Zentrifuge in zweckmäßigen Zentrifugationsgefäßen 20 Minuten bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Inzwischen kann man die Glutathion-Sepharose Säule mit drei bis fünf Säulenvolumen Lysispuffer äquilibrieren. Der Überstand der Zentrifugation wird nun auf die Säule gegeben und einmal recycelt, sodass auch genügend GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose binden können. Das Waschen der Säule mit 50 ml (fünf Säulenvolumen) Lysispuffer dient dazu unerwünschte Rückstände zu entfernen, während die GST-Glutathion-Bindung so fest ist, dass nichts von den gewünschten Zielproteinen ausgewaschen wird. Pro Liter Ansatz muss nun ein Aliquot Thrombin in 2 ml Thrombinspaltpuffer (TSP) gelöst und diese Lösung auf die Säule gegeben werden. Dabei ist es wichtig genug Thrombin, etwa die Hälfte des eingesetzten Volumens, in die Säule einlaufen zu lassen, damit das Thrombin auch das Ziel-Protein vom GST spaltet. Das Thrombin lässt man über Nacht im Kühlraum einwirken. Am nächsten Tag sammelt man Fraktionen (Elution von Thrombin und Protein) von je 1ml ein. Um das Thrombin vom gewünschten Protein zu trennen, wird es mit Benzamidinbeads (beads=Perlen) präzipitiert. Um die nötigen Beads vorzubereiten, wird die Beads-Ausgangs-Suspension (etwa 500 μ l) drei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen (vorsichtig mit der Pipette abnehmen) und zu den Beads dann ein Milliliter TSP dazu gegeben, um anschließend erneut drei Minuten bei 3000 rpm zu zentrifugieren. Dieser Zyklus wird noch zweimal wiederholt. Danach werden die gewaschenen Beads 1:1 mit TSP resuspendiert. Zu den Fraktionen werden dann 80 μ l (bzw. später 40 μ l) Beadsuspension gegeben. Diese Mischung wird darauf folgend 30 Minuten bei 4°C über Kopf geschüttelt. Abschließend werden die Beads abzentrifugiert und im Überstand ist nun nur noch das gewünschte Protein, von dem an dann zum Beispiel mittels Bradford-

Reagenz und Opazität bei 595 nm Wellenlänge die Konzentration gemessen werden kann oder zur andersartigen Überprüfung ein 12%-prozentiges SDS (Natriumdodecylsulfat)-Gel beladen werden kann.

Auch hier sind die soeben beschriebenen einzelnen Schritte in Protokollform im Anhang zu finden.

4 Nähere Themenbetrachtung

Das Wiederaufkommen von bioterroristischen Angriffen (2001) und vor allem das Auftreten antibiotikaresistenter toxinproduzierender Bakterienstämmen machen es notwendig die Erkenntnisse über toxinvermittelte Krankheiten zu erweitern, um diese besser zu verstehen und auch besser begegnen zu können. Das Wissen um Wirkungsweisen von Toxinen ist in den Jahrzehnten enorm gestiegen, sodass Wissenschaftler mit diesen Informationen die ursprünglich giftigen Eigenschaften jener zum Aufklären von Problemen der Zellbiologie, der Physiologie und der Pharmakologie nutzen konnten.

Viele Bakterientoxine teilen die Eigenschaft hoch spezialisierte Enzyme zu sein, befähigt eukaryontische Zellen zu betreten und dort mittels katalysierenden Reaktionen Signalwege und physiologische Prozesse zu beeinträchtigen oder zu unterbrechen, was häufig morphologische Veränderungen, zelluläre Schäden oder den Zelltod zur Folge hat.³

Doch wegen der hohen Spezifität können und werden Bakterientoxine auch als selektive und effiziente Werkzeuge genutzt, um molekulare Mechanismen der Signaltransduktion und Physiologie aufzuklären.

Solch ein wertvolles Werkzeug ist auch PMT. Denn die grundsätzliche Motivation der Forschungen über dieses Toxin sind nicht etwa Wege dieses zu bekämpfen, sondern mit ihm die Signalwege der wichtigen G-Proteine aufzuklären. Um PMT wirklich vollständig und sensitiv als Werkzeug nutzen zu können, muss der genaue Wirkmechanismus dieses bakteriellen Toxins geklärt werden. Denn in Wildform löst es verschiedenste Effekte aus. So verursacht es bei Schweinen atrophische Rhinitis, bei der die nasalen Knochen des Tieres resorbiert werden, bei Hasen eine Pneumonie-ähnliche respiratorische Krankheit und bei verschiedenen Organismen dermonekrotische Symptome. Auch der Mensch ist durch PMT angreifbar, etwa durch eine Infektion durch Biss- oder Kratzwunden von Haustieren. Es wird vermutet, dass PMT im Menschen zu Meningitis und Endocarditis führen kann. Allerdings wirkt es in vielen Zelllinien auch mitogen, d.h. die Zellen werden zur Proliferation (Teilung) angeregt.

Die Beantwortung der Frage nach dem genauen Wirkmechanismus gelang der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories und Dr. Joachim Orth erst jüngst, der entsprechende Artikel wurde im April dieses Jahres in der PNAS veröffentlicht.

Mit Hilfe eines 2D-Gels (s. 3 Methoden und Material) wobei ein „Shift“ (Verschiebung) von 0,07 pI-Einheiten (entspricht der pH-Wert-Differenz zweier isoelektrischer Punkte)

³ frei übersetzt nach: Wilson, B.H. und Ho, M.: *Pasteurella multocida* toxin as a tool for studying G_q signal transduction, Rev Physiol Biochem Pharmacol., 2004

zwischen nativen G_i und mit PMT behandelten G_i konnte nachgewiesen werden, dass das PMT in der GTPase-Domäne des G-Proteins ein Glutamin zur Glutaminsäure deamidiert (zur Deamidation s. 3 Material und Methoden). Durch diese minimale Modifikation des G-Proteins, die unter anderem eine Konformationsänderung nach sich zieht, ist dieses nicht weiter im Stande gebundenes GTP zu hydrolysieren, wodurch es in einen beständig aktiven Zustand versetzt wird.

Das so aktivierte G_i -, G_q - oder $G_{12/13}$ -Protein wirkt nun auf seine jeweiligen Effektormoleküle ein. Wichtigste beim am besten erforschten G_q ist die Phospholipase C (PLC, s. Abb.6) und die Adenylat-Cyclase (s. Abb.7).

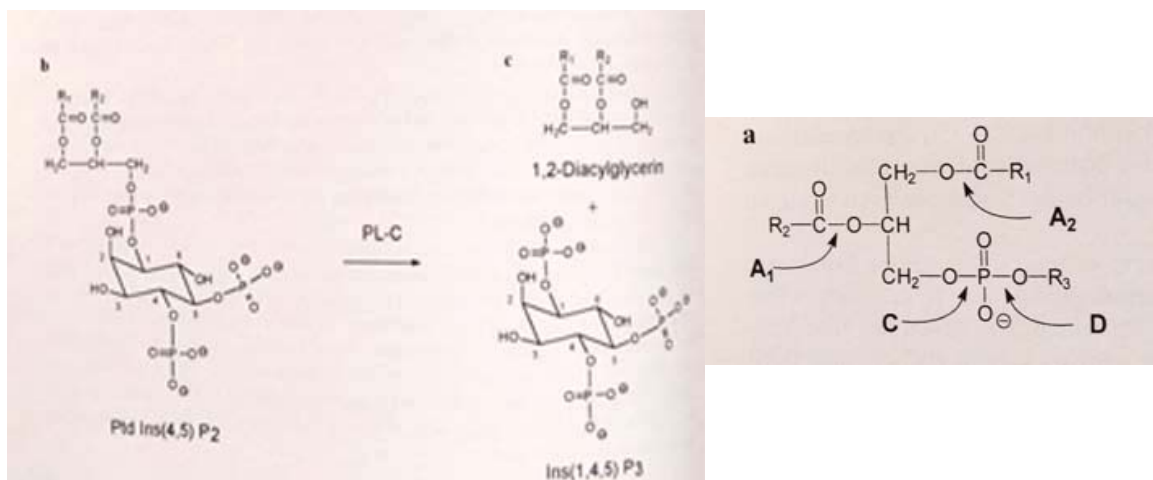


Abb.6a,b: Phospholipase C: Die Spaltung von Phospholipiden und die Ansatzstellen der verschiedenen Phospholipasenarten, Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997, Seite 220

PLC setzt Phospholipide zu den „Second Messengern“ Phosphoinositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) um, die dann wiederum weitere Effektormoleküle aktivieren und somit eine Kaskade an verschiedensten Prozessen in Gang setzen.

Die Adenylat-Cyclase wandelt das bekannte ATP (Adenosintriphosphat) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP, s. Abb.7) um, was einen weiteren „Second Messenger“ darstellt und wiederum vielfältige Folgereaktionen hervorruft.

Für genauere Informationen zu den erwähnten Folgereaktionen sei auf weiterführende Literatur im Anhang verwiesen.

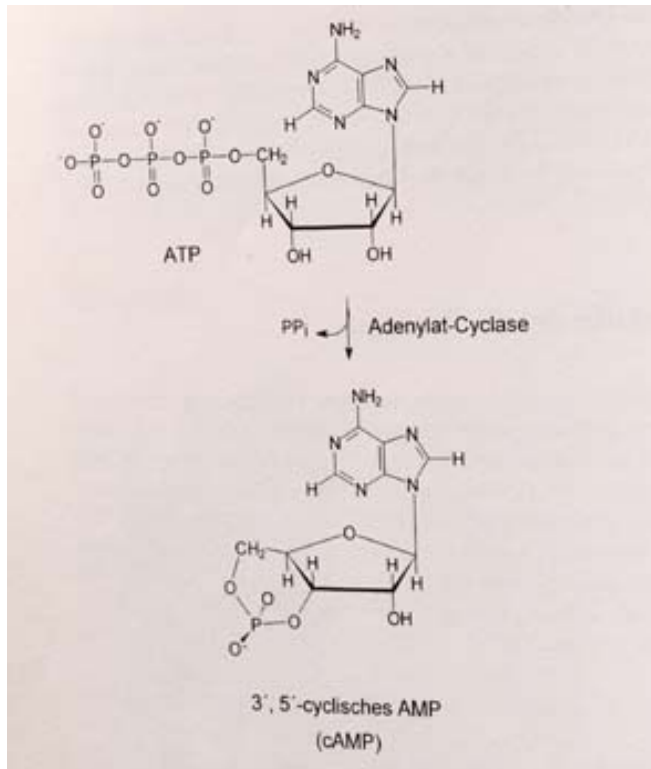


Abb.7: cAMP-Synthese, Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997, Seite 216

Die erwähnten Substanzen IP₃ und cAMP können radioaktiv markiert, beziehungsweise werden der Zelle radioaktiv markierte Ausgangsstoffe dieser Moleküle zugesetzt, sodass man dann mit entsprechenden Methoden (s. 3 Methoden und Material) die Aktivität der G-Proteine und darüber die Aktivität des PMT prüfen kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass PMT inzwischen ein hervorragendes Werkzeug ist, um G-Protein-vermittelte Signalwege, eine der wichtigsten Formen der Signaltransduktion höherer Organismen, zu erforschen. Ein Überblick über die genauen Anwendungsgebiete ist in der weiterführenden Literatur zu finden.

Als Schlussbemerkungen möchte ich noch einen interessanten Fakt und noch offene Fragen zum PMT auführen. Erstaunlich am PMT ist, dass es bereits in Bereich pikomolarer Konzentrationen die gewünschten Effekte zeigt und nebenbei hervorragend in *Escherechia coli* zu exprimieren und aufzureinigen ist, was noch einmal die exzellente Eignung als molekulares Werkzeug unterstreicht.

Bisher wirft die Substratspezifität des PMT noch Fragen auf, die sicher in nächster Zeit noch geklärt werden, es wird jedenfalls bereits intensiv, u.a. von der AG Aktories/Orth, daran geforscht. Und zwar modifiziert PMT G_q nicht aber das zur gleichen Familien gehörende und zu 90% identische G₁₁. Momentane Forschungen weisen außerdem auf eine ähnliche sehr sensitive Unterscheidung zwischen G₁₂ und G₁₃, letzteres wird aktiviert, hin.

5 Fazit/Rückblick

Auch wenn ich bereits mit Laborarbeit verbundene Praktika, u.a. am chemischen Institut der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bei Frau Dr. Busse, absolvierte, war dieses Praktikum die erste Gelegenheit in den wirklichen Laboralltag mit all seinem Überraschungen und Unwägbarkeiten, Erfolgen und Misserfolgen und damit Frohsinn und Glück zu erleben. Diese Erfahrungen sind für mich sehr wichtig und wertvoll. Am Umstand der Schnelligkeit des Vergehens der vier Wochen in Freiburg ist ein eindeutiges Indiz, dafür dass mir die Zeit sehr gefiel, was zu einem großen Teil an der interessanten und immer von neuem spannenden Arbeit am Institut zu verdanken ist. Trotz allem hatte das Praktikum nicht die Wirkung einer Initialzündung zur Entscheidung Toxikologe, Pharmakologe oder Genetiker zu werden, was allerdings keinesfalls als Aufgabe einer solchen Unternehmung anzusehen ist. Mein Interesse für Naturwissenschaften bleibt mir erhalten, jedoch auch weiterhin so weit gefächert, so besteht Neugier auf den Gebieten der Geographie, Chemie (organisch, anorganisch), Geschichte, Physik, Literatur und natürlich Biologie, dass mir eine Festlegung in absehbarer Zeit fortwährend schwer fällt. Vom „Leben als Wissenschaftler“ weiß ich nun zu ein wenig zu berichten. Klar geworden ist, dass es nur möglich ist, wenn man starke Begeisterung und Wissbegier bezüglich seines Arbeitsthemas besitzt, anders ist bereitwillige Hinnahme der langen und komplizierten Arbeiten oder die Ableistung von Überstunden in Form von „Wochenendarbeit“ nicht zu erklären. Des Weiteren sind Geduld und starke Nerven essentiell zum wissenschaftlichen Arbeiten, da ansonsten die Probleme mit vielfach fehlschlagenden Versuchen, streikenden Maschinen oder einfach die fragenden Mitarbeiter nicht zu überwinden sind. Wissenschaftliches Arbeiten ist also eine Herausforderung für sich und natürlich hält es auch seine genrespezifischen Freuden bereit.

Wie vielleicht zum Ausdruck kam, war ich mit der Betreuung und Integration in die Arbeitsgruppe sehr zufrieden. Ich wurde möglichst oft in für mich neue Arbeiten eingespannt. Neben der aktiven Teilnahme an vielerlei Arbeiten und Experimenten, wurden mir die theoretischen Hintergründe und Ziele der einzelnen Projekte verständlich und auf Wunsch auch mehrmals erklärt. Durch die Vielfältigkeit der Versuche und den häufigen Wechsel meiner Betreuer verlor ich manchmal zwar den Überblick, jedoch wurde mir dieser auf Nachfrage wieder gegeben. Die Mitarbeiter der AG Aktories/Orth beziehungsweise des gesamten Instituts begegneten mir durchweg freundlich, was auch die angenehme Arbeitsatmosphäre im Haus widerspiegelt. Besonders dankbar bin ich für die mir gegebene und von mir genutzte Möglichkeit an den Fachgruppen- und Literaturseminaren teilzunehmen.

So konnte ich nicht nur auch Einblick in die Arbeiten anderer Forschungsgruppen erhalten, sondern mir wurde die Wichtigkeit des Beherrschens der englischen Sprache vor Augen geführt (die Seminare wurden auf Englisch gehalten).

Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Aktories/Orth, dazu gehören Dr. Joachim Orth, Inga Preuß, Ines Fester, Silke Fieber, Petra Bartholomé und natürlich Björn Schorch für die Durchführung des behandelten Praktikums. Letzterem ist als Person für die vorrangige Betreuung und Organisation in Freiburg und stellvertretend für den Förderverein der Biologieolympiade e.V. für die Ermöglichung des Praktikums selbstverständlich besonderer Dank sicher. Abschließend sei noch meiner Biologielehrerin Dagmar Darge gedankt, ohne deren Engagement ich wohl nie auf die IBO gestoßen wäre.

6 Quellenverzeichnis

Literatur:

Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10.Auflage, Urban & Fischer Verlag der Elsevier GmbH, München 2009

Newton, C.R. und Graham, A.: PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford 1994

Krauss, Gerhard: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion – Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1997

Artikel:

Aktories, Klaus: *Pasteurella multocida* toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation, PNAS, 2009

Orth, Joachim H.C.; Preuß, Inga; Fester, Ines; Schlosser, Andreas; Wilson, Benda A. und Wilson, B.H. und Ho, M.: *Pasteurella multocida* toxin as a tool for studying G_q signal transduction, Rev Physiol Biochem Pharmacol. N^o 93-109, 2004

Internetseiten:

www.ovgu.de

www.uni-freiburg.de

sonstiges:

Preuß, Inga und Orth, Joachim H.C.: Activation of heterotrimeric G proteins by *Pasteurella multocida* toxin, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2009 (Powerpoint-Präsentation)

7 Anhang

Polyethylenimin (PEI)-Transfektion von HEKs

- 10cm-Schalen HEKs aussähen, Zellrasen sollte für Transfektion zu 70% konfluent sein
- Transfektionsreagenz für 10cm-Schale:
 - 500µl Opti-MEM
 - 6µg DNS
 - 25µl PEI
- schwach vortexen, 15min bei RT inkubieren
- tropfenweise auf Zellen geben
- nach 5-6h Mediumwechsel

Amaza-Transfektion von MEFs

- 1 mittlere Stammflasche mit 5ml PBS waschen
- 3ml Trypsin + 7ml Medium = 10ml Gesamtvolumen
- in 15ml-Falcon überführen
- Zellen zählen:
 - 160 Zellen im Quadrat = 1,6Mio Zellen/ml, 2Mio Zellen werden pro Transfektionsansatz benötigt
 - 1,6Mio – 1ml
 - 16Mio – 10ml
 - 2Mio – 1,25ml
- jeweils 2Mio Zellen pro Transfektionsansatz in ein 15ml-Falcon pipettieren
- zentrifugieren bei 800rpm für 3min
- ÜS komplett mit Pipette entfernen, Falcons aufheben
- Zellen in 100µl Amaza-Reagenz + 10µg DNS (nicht mehr als 10µl!) resuspendieren
- Zellen in Elektroporationsküvette überführen
- alte Falcons mit 6ml Medium befüllen
- Elektroporation: Programm A33
- Plastikpipette mit Medium befüllen, Medium zu elektroporierten Zellen geben, alles aufsaugen, dabei aufpassen, dass man den Schleim nicht erwischt, in die Falcons zu dem Medium pipettieren
- 500µl/well in 24well-Platte geben

GST Fusionsproteine (aus 1 l) mit Thrombin

Proteinaufreinigung

1. Vorkultur: 50 mL LB_{Amp} Medium mit den gewünschten Zellen animpfen (mit Pipettenspitze im Kryoeppi kratzen, wenn 2L Proteinaufreinigung, 100ml LB_{Amp} Medium)
2. 50 ml-Vorkultur (bzw. 100 mL Vorkultur) ü. N. bei 37°C schütteln
3. 50 ml-Vorkultur in 1 l LB_{Amp} überführen
4. bei 37°C schütteln bis OD (600 nm) > 1
5. Induzieren mit 500 µL 1M IPTG
6. 20 h bei 29°C schütteln (bzw. ü. N.)
7. Kultur in Sorvall-Zentrifuge, GS3-Rotor ernten (5000 upm, 15 min)
8. Pellet in 15 ml Lysispuffer resuspendieren
9. 3 mal 30 sec beschallen (cycle: 70, power: 50% mit je 1 minütiger Pause)
10. Zellen mit French-Press aufschließen
11. Lysat zentrifugieren (SS-34-Rotor, 12000 upm, 20 min, 4°C)
12. Glutathion-Sepharose Säule mit 3-5 Säulenvolumen (3-5 x 10 mL) Lysispuffer äquilibrieren
13. Überstand der Zentrifugation (Punkt 11) auf Säule geben und 1x recyclieren
14. Säule mit 50 ml (5x 10 mL) Lysispuffer waschen
15. pro 1 l Ansatz ein Aliquot (bei 2L zwei Aliquot) Thrombin in 2 ml Thrombinspalt-puffer lösen(TSP), auf die Säule geben
16. ü. N. Kühlraum
17. Fraktionen (in der Regel 6 Fraktionen) von je 1 ml sammeln (Elution mit TSP)
18. Fraktion 1 und 2 sammeln, 15 min Pause, Fraktion 3 und 4 sammeln, 15 min Pause dann Fraktion 5 und 6
19. Beads äquilibrieren: Benzamidinbeads (ca. 500 µL) zentrifugieren, 3000 upm, 3 min
20. Überstand verwerfen, 1 mL TPS dazu und erneut zentrifugieren, 3000 upm, 3 min
21. Zyklus dreimal wiederholen,
22. Beadssuspension herstellen: zentrifugierte Beads 1:1 mit TPS resuspendieren,
23. F1 bis F3 80µl und F4 bis F6 40µl Beadssuspension
24. 30 min, 4°C, über Kopf schütteln
25. Beads abzentrifugieren (3', 6500 rpm, 4°C)
26. ÜS → Bradford → 12 % SDS Gel

Lysispuffer:

- 50 mM Tris, pH 7,5
- 50 mM NaCl

Thrombinspalt-puffer:

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 50 mM NaCl
- 2.5 mM CaCl₂

Subfamily	G α	Signaling ^a	Modulating toxin	Toxin effect on G α	References ^b
G _i subfamily	G _{i1}	↓AC	PT	Inhibition	(a) (b)
	G _{i2}	↓AC	PT	Inhibition	(a) (b)
	G _{i3}	↓AC	PT	Inhibition	(a) (b)
	G _o	↓Ca ²⁺ channels	PT	Inhibition	(a) (b)
	G _t	↑cGMP-PDE	PT	Inhibition	(a) (b) (c)
			CT	Activation	(a) (b) (d)
	G _{gust}	↑PDE	PT	?	(e)
G _s subfamily	G _z	↓AC	?	?	(f) (g)
	G _s	↑AC	CT	Activation	(a) (b)
	G _{olf}	↑AC	CT	Activation	(h)
G _q subfamily	G _q	↑PLC β , ↑Rho	PMT	Activation/ Inhibition ^c	(i) (j) (k)
	G ₁₁	↑PLC β , ↑Rho	?	?	(k)
	G ₁₄	↑PLC β	?	?	
	G ₁₅	↑PLC β	?	?	
	G ₁₆	↑PLC β	?	?	
G ₁₂ subfamily	G ₁₂	↑Rho	?	?	
	G ₁₃	↑Rho	?	?	

^a AC: adenylate cyclase; PDE: phosphodiesterase; PLC: phospholipase C

^b (a) (Fields and Casey 1997), (b) (Casey and Gilman 1988), (c) (Van Dop et al. 1984a), (d) (Van Dop et al. 1984b), (e) (Gilbertson et al. 2000), (f) (Casey et al. 1990), (g) (Ho and Wong 2001), (h) (Jones et al. 1990), (i) (Wilson et al. 1997), (j) (Zywietz et al. 2001), (k) (Vogt et al. 2003)

^c Initial activation, followed by uncoupling of G_q signaling. Prolonged treatment with PMT results in inhibition

Tabelle1: Signaling of heterotrimeric G-proteins and their modulating toxins, B. A. Wilson and M. Ho: *Pasteurella multocida* toxin as a tool for studying G_q signal transduction, *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004 ; 152: 93–109