



### **Astrid Rohrbeck**

**2016:** Habilitation, Venia legendi für Pharmakologie und Toxikologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)

**Seit 2010:** Gruppenleiterin am Institut für Toxikologie der MHH

**2007 – 2010:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin des Fraunhofer Instituts Hannover (ITEM, Hannover)

**2004 – 2007:** Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**2000 – 2003:** Diplom (Neurobiologie) an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**1998 – 2000:** Vordiplom (Humanbiologie) an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

### **Name des Preises**

**GT – *Toxins Award* für das beste Poster**

### **Titel**

“Functional Role of Arg-Gly-Asp (RGD)-Binding Site of C3”

---

Astrid Rohrbeck

Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover

Das von *Clostridium botulinum* abgegebene C3 Exoenzym (C3) ist eine ADP-Ribosyltransferase, die eine ADP-Ribose von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) selektiv auf die GTPasen RhoA, B und C [1] überträgt, wodurch die GTPasen funktionell inaktiviert werden [2]. Bei C3 handelt es sich um ein einkettiges Exoenzym, dem im Gegensatz zu anderen bakteriellen Toxinen, wie z.B. dem clostridialen C2-Toxin, eine Rezeptorbinde- und Translokationsdomäne fehlt, mit der sich Toxine selbst in intakte Zellen einschleusen und in das Zytosol gelangen können. Um dennoch C3 effizient in eukaryontische Zellen einzubringen, erfolgten Manipulationen wie Mikroinjektionen, Elektroporation oder Permeabilisierung mit Digonin oder der Einsatz von chimären C3-Toxinen [3-6]. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch durch den Nachweis des intrazellulären ADP-ribosylierten Rho zeigen, dass C3 in verschiedene Zelllinien, die aufgrund fehlender C3-induzierten morphologischen Veränderungen in der Literatur als insensitiv gegenüber C3 beschrieben waren, innerhalb weniger Minuten bis Stunden das Zytosol erreicht [7]. Mit verschiedenen Bindungs-Assays wurde gezeigt, dass C3 trotz Fehlens einer klassischen Bindedomäne an intakte Zellen bindet und diese Interaktion durch posttranslationale Modifikationen beeinflussbar ist [8]. Die Kombination von Overlay-Assays und Massenspektrometrie führte zur Identifikation des Intermediärfilamentes Vimentin als membranärer Interaktionspartner von C3 [9]. Weiterführende Experimente mit Vimentin siRNA und Vimentin knock-out Zellen zeigten, dass Vimentin nicht nur an der Bindung von C3 beteiligt ist, sondern auch bei der Aufnahme des C3 Exoenzyms eine wesentliche Rolle spielt [10]. Trotz der erfolgreichen Reduktion des Vimentingehaltes durch den Einsatz von siRNA und auch in den Vimentin knock-out Zellen konnte die Aufnahme von C3 nicht vollständig gehemmt werden. Dies deutet auf wenigstens einen weiteren Bindepartner hin. Deshalb erfolgten Strukturanalysen an verschiedenen C3-Isoformen, die zeigten, dass C3 in der Aminosäuresequenz ein sogenanntes RGD-Motiv enthält. Aminosäuresequenzen wie das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) dienen Integrinen als Bindungssepitop. Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die extrazelluläre Liganden, z.B. Fibronectin, binden und die in der Endozytose verschiedener Liganden involviert sind.

Das Ziel der Studie war es, die funktionelle Rolle des RGD-Motivs in der Bindung und Aufnahme des C3 Exoenzyms zu untersuchen. In Versuchen an der immortalisierten hippocampalen Zelllinie HT22 führte die Inkubation mit dem RGD-bindenden Protein GRGDNP zu einer signifikant verminderten C3-Bindung an den intakten Zellen sowie zu einer deutlich geringeren Aufnahme von C3. Auch die Vorinkubation der HT22 Zellen mit einem Antikörper gegen  $\beta$ 1-Integrin führte zur reduzierten Bindung von C3 an den Zellen. Dies deutet auf eine Beteiligung des RGD-Motivs an der Bindung von C3. Deshalb wurde das RGD-Motiv von C3 durch Mutation verändert und Bindungs-Analysen an verschiedenen Zelllinien mit diesen C3-RGD-Mutanten durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten eine verminderte Bindung der C3-RGD-Mutanten im Vergleich zu dem mitgeführten C3-Wildtyp. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das C3-RGD-Motiv an der Bindung an intakte Zellen beteiligt ist. Die Relevanz des in C3 enthaltenen RGD-Motivs an der Bindung wird zurzeit im neuronalen Modell an Synaptosomen untersucht.

## Literatur:

- [1] Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. (1989). Asparagine Residue in the rho Gene Product Is the Modification Site for Botulinum ADP-ribosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 8602–8605.
- [2] Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. (1998). Glucosylation and ADP763 ribosylation of Rho proteins: Effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector764 coupling. *Biochemistry* 37:5296-5304.
- [3] Nobes CD, Hall A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81:53–62.
- [4] Stasia MJ, Jouan A, Bourmeyster N, Boquet P, Vignais PV. (1991). ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of Clostridium botulinum and effect on the cell motility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180:615–622.
- [5] Mackay DJG, Esch F, Furthmayr H, Hall A. (1997). Rho- and Rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: An essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *Journal of Cell Biology*, 138:927–938.
- [6] Barth H, Hofmann F, Olenik C, Just I, Aktories K. (1998). The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2\_toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun*. 66:1364-9.
- [7] Rotsch J, Rohrbeck A, May M, Kolbe T, Hagemann S, Schelle I, Just I, Genth H, Huelsenbeck SC. (2012). Inhibition of macrophage migration by C. botulinum exoenzyme C3. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 385:883-90.
- [8] Rohrbeck A, Von Elsner L, Hagemann S, Just I. (2014). Binding of Clostridium botulinum C3 exoenzyme to intact cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387:523–532.
- [9] Rohrbeck A, Schröder A, Hagemann S, Pich A, Höltje M, Ahnert-Hilger G, Just I. (2014). Vimentin mediates uptake of C3bot exoenzyme. *PLoS ONE*, (9(6):e101071).
- [10] Adolf A, Leondaritis G, Rohrbeck A, Eickholt BJ, Just I, Ahnert-Hilger G, Höltje M. (2016). The intermediate filament protein vimentin is essential for axonotrophic effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J. Neurochem*. 139:234–244.