

– *Clostridium difficile* –

**Entdeckung und Charakterisierung der autokatalytischen
Prozessierung von Toxin B**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades des
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Jessica Reineke

geb. am 27.12.1978 in Flint, Michigan/USA

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 10. 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	CLOSTRIDIEN	1
1.1.1	Der Keim <i>Clostridium difficile</i>	2
1.1.2	<i>Clostridium difficile</i> assoziierte Erkrankungen	3
1.1.3	Auslöser und Therapie der <i>C. difficile</i> Erkrankungen	4
1.1.4	Große clostridiale Zytotoxine	5
1.1.5	Molekularer Aufbau von TcdA und TcdB	6
1.1.6	Katalytische Aktivität	7
1.2	ZUR AUFNAHME BAKTERIELLER TOXINE IN EUKARYOTE ZELLEN	9
1.2.1	AB-Toxine	9
1.2.1.1	Die Wege der Toxinaufnahme	11
1.2.1.2	Abspaltung der katalytischen A-Domäne	14
1.2.1.3	Aufnahme und Prozessierung der <i>C. difficile</i> Toxine A und B	15
2	FRAGESTELLUNG	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	GERÄTE UND MATERIALIEN	20
3.1.1	Chemikalien	20
3.1.2	Geräte	21
3.1.3	Zelllinien	22
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	22
3.2.1	Kultivierung von T2-Zellen	22
3.2.2	Kultivierung von IHKE-Zellen	22
3.2.3	Kryokonservierung	23
3.2.3.1	Einfrieren	23
3.2.3.2	Auftauen	23
3.2.4	Herstellung von Milzzellextrakt	23
3.2.5	Mikroinjektion	24
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
3.3.2	Zink-Proteinfärbung	25
3.3.3	Deep Purple Total Protein Stain	26
3.3.4	Modifikation von Toxinen	26
3.3.4.1	Kopplung von Cy3 an Toxin A und B	26
3.3.4.2	EPNP-Modifizierung von Toxin B	26
3.3.5	Spaltungsassay	27
3.3.6	HPLC-Aufreinigung	27
3.3.6.1	HPLC-Aufreinigung von Milzzellextrakt	27
3.3.6.2	Affinitätsreinigung von Toxin B	28
3.3.6.3	HPLC-Aufreinigung der Toxin B Spaltprodukte	29

3.3.7	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	29
3.3.8	<i>Enzymatische Versuche</i>	29
3.3.8.1	Proteinase K	29
3.3.8.2	RNAse I und DNAse I	30
3.3.9	<i>In-Gel-Verdau</i>	30
3.3.10	<i>Massenspektrometrische Analysen</i>	31
3.3.10.1	Analysen von HPLC-Fractionen	31
3.3.10.2	Analyse von EPNP-modifiziertem und unmodifiziertem Toxin B	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	KOPPLUNG VON TcDB MIT DEM CY3 FLUORESCENZFARBSTOFF	33
4.2	TESTUNG VON ZELLEXTRAKTEN	34
4.3	HPLC-AUFREINIGUNGEN ZUR ISOLIERUNG DER TcDB-SPALTENDEN PROTEASE	36
4.4	EINGRENZUNG DER SUBSTANZKLASSE DER TcDB-SPALTENDEN ZYTOSOLISCHEN FAKTOREN	42
4.4.1	<i>Suche nach Proteinen im Deep Purple-gefärbten SDS-PAGE</i>	43
4.4.2	<i>Physiko-chemische Untersuchungen</i>	44
4.4.3	<i>Enzymatische Untersuchungen</i>	45
4.4.4	<i>Massenspektrometrische Untersuchungen</i>	47
4.5	EINSATZ VON INOSITOLPHOSPHATEN IM TcDB-SPALTUNGSASSAY	54
4.6	BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR NATUR DES SPALTENDEN ENZYMS	57
4.6.1	<i>Toxin B-Präparation in der Massenspektrometrie</i>	57
4.6.2	<i>Affinitätsreinigung von TcdB</i>	58
4.6.3	<i>Test auf unspezifische Proteolyse</i>	59
4.6.4	<i>Untersuchung der Trans-Reaktivität IP6-aktivierter Toxin B-Präparationen</i>	61
4.6.5	<i>Inter- oder intramolekulare Reaktion?</i>	63
4.7	IDENTIFIZIERUNG DES KATALYTISCHEN ZENTRUMS	64
4.7.1	<i>EPNP-Modifizierung von Toxin B</i>	64
4.8	CHARAKTERISIERUNG DER AUTOPROTEOLYSE	69
4.8.1	<i>Geschwindigkeit der Autoproteolyse</i>	69
4.8.2	<i>Untersuchung auf eine Kaskadenreaktion</i>	70
4.9	BEDEUTUNG DER AUTOKATALYSE FÜR DEN INTOXIKATIONSPROZESS	71
4.9.1	<i>Zytopathische Effekte nach extrazellulärer Applikation</i>	71
4.9.2	<i>Zytopathische Effekte nach intrazellulärer Applikation</i>	73
4.10	AUTOKATALYTISCHE SPALTUNG ANDERER LCTS	74
5	DISKUSSION	75
5.1	PARADIGMENWECHSEL – VOM PROTEIN ZUM INOSITOLPHOSPHAT	75
5.1.1	<i>Ausschluss von Proteinen als Träger der Spaltaktivität der Milzextrakte</i>	75
5.1.2	<i>Massenspektroskopie zur Eingrenzung der Substanzklasse</i>	77
5.1.3	<i>Inositolphosphate-IP6</i>	77
5.1.4	<i>Vergleichende Untersuchung von IP-Isomeren</i>	78
5.1.5	<i>Charakteristika des aktiven IP6</i>	78

5.2	DIE AUTOKATALYTISCHE SPALTUNG	79
5.2.1	<i>Inositolphosphate besitzen keine Proteaseaktivität</i>	79
5.2.2	<i>Mit Pepstatin A auf der Spur zur Aspartatprotease</i>	79
5.2.3	<i>Ausschluss TcdB-kontaminierender Proteine</i>	80
5.2.4	<i>Die Identifizierung der intrinsischen Protease</i>	81
5.2.5	<i>Kovalente Blockade der Aspartatprotease</i>	81
5.3	ZWEITE KONFORMATIONSÄNDERUNG UND MODELL DES ABLAUFES DER TRANSLOKATION	82
5.3.1	<i>Inositolphosphat-Interaktion und Auswirkung auf TcdB</i>	82
5.3.2	<i>TcdB – von der Aufnahme bis zur toxischen Schädigung</i>	83
5.4	KRITISCHE WÜRDIGUNG VON VORPUBLIKATIONEN ZUR TRANSLOKATION	85
5.4.1	<i>Zum Einsatz von Inositolphosphaten in Vorpublikationen</i>	85
5.4.2	<i>Zur Autoproteolyse in Vorarbeiten</i>	86
5.5	INDUZIERTE AUTOPROTEOLYSE BEI ANDEREN TOXINEN	87
5.5.1	<i>Large Clostridial Cytotoxins</i>	87
5.5.2	<i>Erweiterung auf RTX-Toxine</i>	88
5.5.3	<i>Cysteinprotease-Aktivität auch in LCTs</i>	89
5.6	VERGLEICH DER PROZESSIERUNG UNTERSCHIEDLICHER BAKTERIELLER TOXINE	90
5.7	BIOLOGISCHE RELEVANZ	92
5.8	AUSBLICK	94
5.8.1	<i>Wissenschaftlicher Ausblick</i>	94
5.8.2	<i>Therapeutischer Ausblick</i>	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	97
8	LEBENS LAUF	108

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Mikroskopisch-pathologische Veränderungen bei Pseudomembranöser Kolitis</i>	3
<i>Abbildung 2: Das Drei-Domänen-Modell der LCTs</i>	7
<i>Abbildung 3: Der GTPasen-Zyklus</i>	8
<i>Abbildung 4: Die 3D-Struktur des Diphtherietoxins</i>	12
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von AB-Toxinen</i>	14
<i>Abbildung 6: TcdB Spaltungsassay</i>	16
<i>Abbildung 7: Die Prozessierung von Toxin B in der Zelle</i>	18
<i>Abbildung 8: Einsatz von CHO-Zellextrakten zur Spaltung von Cy3-markiertem TcdB</i>	34
<i>Abbildung 9: Reinigungsstufe I: Aufreinigung von Milzextrakt über DEAE-Säule</i>	37
<i>Abbildung 10: Reinigungsstufe II: Trennung der aktiven Fraktionen B7-C6 aus Schritt I durch</i>	38
<i>Abbildung 11: Reinigungsstufe III: Trennung der aktiven Fraktionen B1-B7 aus Schritt II durch</i>	39
<i>Abbildung 12: Reinigungsstufe IV: Anreinigung der gepoolten Fraktionen B5-C1 aus Schritt III</i>	40
<i>Abbildung 13: Reinigungsstufe V: Anreinigung der gepoolten Fraktionen IV.C7-C11 durch erneuten</i>	41
<i>Abbildung 14: Reinigungsstufe VI: Abschließende Reinigung der Fraktionen C3-C6 aus Schritt V</i>	42
<i>Abbildung 15: Versuch des Nachweises geringer Proteinnengen im SDS-PAGE nach Deep Purple</i>	43
<i>Abbildung 16: Vergleichende TcdB-Spaltungsassays mit unbehandelten, erhitzten bzw. Phenol-</i>	44
<i>Abbildung 17: Spaltungsassay von aufgereinigtem Zellextrakt nach Proteinase K-Verdau</i>	45
<i>Abbildung 18: Spaltungsassay von aufgereinigtem Zellextrakt nach RNase I-/DNase I-Verdau</i>	46
<i>Abbildung 19: Massenspektrometrische Untersuchungen der Fraktionen VI.C4-C6 im Negativ-Modus</i>	49
<i>Abbildung 20: Darstellung der Massendifferenzen zwischen den Hauptpeaks in Fraktion VI.C5</i>	49
<i>Abbildung 21: Detailliertes Fragmentspektrum (1) des manuell ausgewählten Peaks 578,88 Da</i>	50
<i>Abbildung 22: Detailliertes Fragmentspektrum (2) des manuell ausgewählten Peaks 578,88 Da</i>	51
<i>Abbildung 23: Detailliertes Fragmentspektrum des manuell ausgewählten Peaks 498,91 Da</i>	52
<i>Abbildung 24: Fragmentspektrum von gekauftem Inositol-1,3,4,5-tetrphosphat</i>	53
<i>Abbildung 25: Abspaltung von H₂O und HPO₃ am Beispiel von Inositol-1,3,4,5-tetrphosphat</i>	53
<i>Abbildung 26: Einsatz von Inositolhexaphosphat im Spaltungsassay mit Cy3-markiertem Toxin B</i>	54
<i>Abbildung 27: Unmarkiertes TcdB im TcdB-Spaltungsassay unter Zusatz von Inositolhexaphosphat</i>	55
<i>Abbildung 28: Spaltung von affinitätsgereinigtem Toxin B unter Zusatz von Inositolhexaphosphat</i>	59
<i>Abbildung 29: Versuch des Nachweises extrinsischer Proteasen durch externen Zusatz von Proteinen</i>	61
<i>Abbildung 30: Auswirkung von Inositolhexaphosphat-aktivierten Toxin B-Präparationen auf Toxin A</i>	62
<i>Abbildung 31: IP6-induzierte Spaltung in Abhängigkeit der TcdB-Konzentration</i>	63
<i>Abbildung 32: Auswirkung von EPNP auf die induzierte Spaltung von TcdB</i>	65
<i>Abbildung 33: Massenspektroskopische Analyse tryptischer Fragmente von EPNP-</i>	68
<i>Abbildung 34: Untersuchung der IP6 induzierten TcdB-Spaltung in Abhängigkeit der Zeit</i>	69
<i>Abbildung 35: Untersuchung der putativen spaltenden Aktivität der TcdB-Spaltprodukte von Toxin B</i>	70
<i>Abbildung 36: Zytopathische Effekte nach extrazellulärer Applikation von EPNP-modifiziertem und</i>	72
<i>Abbildung 37: Zytopathische Effekte nach intrazellulärer Applikation von EPNP-modifiziertem und</i>	73
<i>Abbildung 38: Auswirkung von IP6 auf die Spaltung anderer LCTs</i>	74
<i>Abbildung 39: Die Prozessierung von Toxin B auf dem neusten Stand</i>	84

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 40: Sequenzvergleich der LCTs am Aspartatprotease-Motiv</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 41: Sequenzvergleich von Cysteinprotease-Domänen.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 42: Die Spaltung von AB-Toxinen</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 43: Innovative Therapien auf der Basis der neuen Erkenntnisse</i>	<i>95</i>

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung von AB-Toxinen und deren strukturelle Organisation (Menetrey et al. 2005) 10

Tabelle 2: Nukleosid-di- und -triphosphate im TcdB-Spaltungsassay 46

Tabelle 3: Wirkung von käuflichen Inositolphosphaten auf die Effektivität der TcdB-Spaltung..... 56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAD	Antibiotika assoziierte Diarrhö
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum Albumin Fraktion V
C.	Clostridium
CROPS	Clostridial Repetitive Oligopeptides
CT	Cholera-Toxin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure/desoxyribonucleidacid
DT	Diphtherietoxin
EDTA	Natrium-Salz des Ethylendiamintetraacetats
EPNP	1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
GAPs	GTPase Activating Proteins
GEF	GTP Exchange Factor
GTP γ S	Guanosin-5'-[γ -thiol]triphosphat
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie High Performance Liquid Chromatography
IHKE-Zellen	Immortalized Human Kidney Epithelial Cells
IP	Inositolphosphat
IP6	Inositolhexaphosphat
LCT	Large Clostridial Cytotoxin
M	molar (mol/l)
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
PBS	Phosphate buffered saline
PMC	Pseudomembranöse Kolitis

RNA	Ribonukleinsäure/ribonucleidacid
rpm	Rotationen pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TcdA	<i>C. difficile</i> Toxin A
TcdB	<i>C. difficile</i> Toxin B
Tcn α	<i>Clostridium novyi</i> alpha Toxin
TcsL	<i>Clostridium sordelli</i> Letale Toxin
TcsH	<i>Clostridium sordelli</i> Toxin
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Tab.	Tabelle

1 Einleitung

Im zwanzigsten Jahrhundert hat kaum eine medizinische Disziplin mehr zur Hebung der Lebenserwartung (des Gesundheitszustands) der Bevölkerung beigetragen als die Hygiene und Medizinische Mikrobiologie. Zwar kannte man Erkrankungen wie den Wundstarrkrampf bereits im Altertum, dessen Auslöser *Clostridium tetani* wurde aber erst viel später entdeckt (Kobel & Marti 1985). Noch heute sind die Namen der Pioniere der Mikrobiologie und Hygiene wie Robert Koch oder Louis Pasteur bekannt. Mit der Entwicklung der Antibiotika und insbesondere von Substanzen wie Penicillin entstand in der Bevölkerung die sich hartnäckig haltende Meinung, dass der Arzt praktisch jede Infektionskrankheit mit Antibiotika beseitigen kann. Geschlechtskrankheiten wie der Tripper, durch *Neisseria gonorrhoeae*, und die Lues, durch *Treponema pallidum*, aber auch die Schwindsucht, durch *Mycobacterium tuberculosis*, konnten durch Antibiotika zurückgedrängt, Menschen geheilt werden.

Die aufkommende AIDS-Epidemie hat dieses Bild ab Mitte der 80-er Jahre gestört. Bis heute gibt es weder eine kurative Therapie noch eine Möglichkeit einen Impfschutz zu erzeugen. Ähnliches gilt für Malaria-Erkrankungen. Doch auch dem Gebrauch von Antibiotika sind Grenzen gesetzt. Im Krankenhaus sind multiresistente Hospitalkeime seit längerem bekannt (Zahar & Ferroni 2006), deren Behandelbarkeit eingeschränkt ist. Mit der Einführung von Clindamycin in den klinischen Alltag traten zusätzlich Durchfallerkrankungen auf, die zwischen 1977 und 1980 dem Keim *Clostridium difficile* und speziell dessen beiden Toxinen A und B zugeordnet werden konnten (Brazier & Borriello 2000). Untersuchungen zu diesem Krankheitsbild sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.1 Clostridien

Clostridien sind obligat anaerobe, grampositive stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der Bacillaceae. Clostridien kommen ubiquitär vor, finden sich insbesondere im Erdreich, aber auch im Verdauungstrakt von Mensch und Tier. Sie bilden thermoresistente Endosporen und können sich, mit Ausnahmen von *C. perfringens*, aktiv durch ihre peritriche Begeißelung bewegen. Die Gattung zeichnet sich durch einen

ausgeprägten Gärungsstoffwechsel aus. Anhand der entsprechenden Substratverwertung lassen sich die Clostridien in die drei Gruppen der saccharolytischen, peptolytischen und harnsäurespaltenden Clostridien unterteilen.

Unter den Clostridien gibt es einige gefährliche Krankheitserreger wie *C. botulinum*, den Verursacher von Lebensmittelvergiftungen; *C. tetani*, den Tetanus-Erreger; die Erreger des Gasbrands, *C. perfringens*, *C. novyi* und *C. sordellii*; und *C. difficile*, den Erreger von antibiotika-assoziiierter Diarrhö (CDAD) und Pseudomembranöser Kolitis (PMC).

1.1.1 Der Keim *Clostridium difficile*

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile* erfolgte 1935 durch Hall und O'Tool (Hall & O'Tool 1935). Die Forscher isolierten den Keim aus dem Stuhl gesunder Neugeborener und hielten ihn entsprechend für harmlos. Schwierig war allerdings dessen Anzucht, unter anderem, weil *C. difficile* unter anaeroben Bedingungen kultiviert werden muss. Auf die Schwierigkeiten bei der Anzucht weist der Name *difficile* hin (lateinisches Wort für „schwierig“).

C. difficile ist ein grampositives schlankes Stäbchen mit ovalen subterminal gelegenen Sporen. Der Keim ist in der Lage Gelatine zu hydrolysieren (Hafiz & Oakley 1976) und variiert in seiner Größe zwischen 3-16,9 x 0,5-1,9 µm. Bezüglich seiner Substratverwertung gehört *C. difficile* zu der Gruppe der saccharolytischen Clostridien und fermentiert die Monosaccharide Fruktose, Mannose, Glukose, Manitol und Xylose, jedoch keine Disaccharide wie Maltose, Saccharose und Laktose (Hatheway 1990). *C. difficile* bildet einen sehr charakteristischen Geruch nach p-Kreosol, der als „Pferdestall“-Geruch beschrieben wurde (Jones 1989).

Die durch *C. difficile* ausgelöste Erkrankung blieb für lange Zeit unentdeckt, nicht zuletzt auch weil 50-75% aller Kinder unter einem Jahr das Bakterium tragen, ohne eine Erkrankung aufzuweisen (Toma et al. 1988, Welch & Marks 1982). Beim gesunden Erwachsenen ist *C. difficile* dagegen nur bei ca. 3-4% ein Bestandteil der normalen Darmflora (Alfa et al. 1998). Vom Kindes- zum Erwachsenenalter nimmt der Anteil der Träger folglich ab. Dies wird auf Änderungen der Mukosamembran und deren Mikroflora zurückgeführt (Brazier & Borriello 2000).

1.1.2 *Clostridium difficile* assoziierte Erkrankungen

Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmalig eine hämorrhagische Diarrhö nach einem abdominalchirurgischen Eingriff bei einer jungen Frau beschrieben (Finney 1893). Die Frau verstarb nach der Operation, die Pathologen fanden entzündliche Veränderungen und große, gelbe Plaques im Kolon. Da das histologische Bild dieser Plaques membranähnliche Struktur zeigte, wie sie seinerzeit von der Diphtherie her bekannt waren, wurde der Erkrankung der Name „Pseudomembranöse Kolitis“ (PMC) gegeben.



Abbildung 1: Mikroskopisch-pathologische Veränderungen bei Pseudomembranöser Kolitis

Für Pseudomembranöse Kolitis typisch ist das Auftreten von gelben Plaques im Kolon (entnommen aus (Mylonakis et al. 2001)).

Das Bild der PMC trat zunächst bei geschwächten Patienten postoperativ nach schwerwiegenden Eingriffen auf (Riedel 1902), häufte sich dann aber drastisch mit Beginn des „Antibiotikazeitalters“. Besonders die Anfang der Siebziger gegen anaerobe Infektionen eingesetzten Antibiotika Lincomycin und dessen Derivat Clindamycin führten zum verstärkten Auftreten von PMC und der weniger dramatischen Verlaufsform des Antibiotika assoziierten Durchfalls (CDAD) (Tedesco et al. 1974). Die anfängliche Annahme, es handele sich bei dem ätiologischen Agens um einen Virus, führte schließlich zur Entdeckung einer toxischen Aktivität im suspendierten Faeces. Die fehlende Propagierbarkeit der zytotoxischen Aktivität in Kultur führte zum Ausschluss von Viren als Auslöser, die zeitliche Entwicklung des Effektes ließ dann den Schluss zu, dass ein bakterielles Toxin für die Veränderungen verantwortlich ist (Larson et al. 1977, Bartlett et al. 1977). Die Zuordnung der Erkrankung zum Keim *C. difficile* wurde erst 1977 erreicht

(George et al. 1978, Larson et al. 1978), die von *C. difficile* gebildeten Toxine schließlich 1981 identifiziert (Taylor et al. 1981). Zwei Toxine ließen sich aufreinen, die wegen ihrer Aktivität als Enterotoxin (Toxin A) bzw. als Zytotoxin (Toxin B) bezeichnet wurden. Beide Toxine sind seither als Hauptpathogenitätsfaktoren bei der Entstehung der Pseudomembranösen Kolitis anerkannt (Rifkin et al. 1978a, Rifkin et al. 1978b).

Die klinische Manifestation der Erkrankung reicht von milder Diarrhö bis zur Enterokolitis mit deren schwerster Ausprägung, der Pseudomembranösen Kolitis, die mit starken Abdominalschmerzen, Erbrechen, Koliken, Fieber und einer Leukozytose einhergeht. Der Stuhl ist meist mit Schleim, Blut und Eiter durchsetzt. Im drastischen Verlauf kommt es zu Komplikationen wie Darmperforation, Schock, Elektrolytentgleisung oder toxischem Megakolon (Hull & Beck 2004), die zum Tod des Patienten führen können.

1.1.3 Auslöser und Therapie der *C. difficile* Erkrankungen

Beim gesunden Erwachsenen ist die intakte Mikroflora des Darmes relativ resistent gegenüber einer Kolonisation mit *C. difficile*. Diese so genannte natürliche „Kolonisationsresistenz“ wird durch Antibiotika gestört. Heute weiß man, dass fast alle Antibiotika *Clostridium difficile* assoziierte Durchfälle (CDAD) bzw. PMC auslösen können (Gorbach 1999, Freeman & Wilcox 1999). Durch die Antibiotikabehandlung kommt es zur Dysbiose der Darmflora und in Folge dessen zu einem Selektionsvorteil von *C. difficile*, so dass das Bakterium sich ungehemmt vermehren kann.

Bei unkompliziertem Verlauf wird die Erkrankung durch Absetzen des verursachenden Antibiotikums bereits beendet. Wird eine kausale Therapie erforderlich, so ist die vorrangige Behandlungsform *C. difficile* assoziierter Erkrankungen die orale Gabe von Metronidazol. Die Dauer der Therapie mit Metronidazol beträgt meist 10 bis 14 Tage (Bartlett 2002). Alternativ und insbesondere bei schweren Fällen wird Vancomycin verabreicht. Nachteile der effizienteren Vancomycin-Therapie sind die höheren Kosten und die Gefährdung durch vancomycin-resistente Enterokokken (Poutanen & Simor 2004).

Doch auch die klassische, kurative Antibiotikatherapie löst eine Dysbiose der Mikroflora des Darms aus. Diese Störung der physiologischen Darmflora ist die Voraussetzung für die Häufung von Rückfällen der *C. difficile* Erkrankungen, an denen eine Reihe von

Patienten leiden. Durchschnittlich 20 % der mit den etablierten Therapien behandelten Patienten erleiden ein Wiederauftreten der Antibiotika-assoziierten Diarrhö. Die Reinfektion kann von dem gleichen *C. difficile*-Stamm ausgelöst werden, vor allem wenn der Patient dem gleichen hospitalen Risikoumfeld ausgesetzt ist. Aber auch andere Stämme sowie das Auskeimen der im Darm vorliegenden Sporen können verantwortlich sein (Fekety et al. 1997). 50-65 % der Patienten, die bereits einen Rückfall erlitten haben, erleiden erneute Reinfektionen (McFarland et al. 1999), 3-5 % der Fälle haben sogar mehr als 6 Rückfälle (Mylonakis et al. 2001).

Nach alternativen Behandlungsformen wird intensiv gesucht. So haben mehrere Studien gezeigt, dass *Saccharomyces boulardii* einen positiven Einfluss auf die Rate der Reinfektionen ausübt. Wurde *Saccharomyces boulardii* bei Patienten mit einer Reinfektion in Kombination mit Metronidazol oder Vancomycin verabreicht, so konnte die Wahrscheinlichkeit, an einer erneuten Infektion zu erkranken, signifikant gesenkt werden (McFarland et al. 1994). Diese Wirkung wird in Zusammenhang mit einer von *S. boulardii* produzierte Serinprotease diskutiert, die die *C. difficile* Toxine A (TcdA) und B (TcdB) proteolytisch spalten soll (Castagliuolo et al. 1999).

1.1.4 Große clostridiale Zytotoxine

Die beiden von *C. difficile* gebildeten Toxine TcdA und TcdB gehören zu der Familie der großen clostridialen Zytotoxine (LCTs). Die Toxine dieser Familie zeichnen sich durch ähnliche funktionelle und strukturelle Eigenschaften aus (Eichel-Streiber et al. 1996, Just & Gerhard 2004). Zu den LCTs gehören neben TcdA und TcdB von *Clostridium difficile*, das Letale (TcsL) und Hämorrhagische Toxin (TcsH) von *Clostridium sordellii*, das α -Toxin (Tcn α) von *Clostridium novyi* (Eichel-Streiber et al. 1996) und das erst kürzlich entdeckte TpeL Toxin von *Clostridium perfringens* Typ C (Amimoto et al. 2007).

LCTs sind einkettige Moleküle mit einer molaren Masse zwischen 190 und 308 kDa. Sie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf (Eichel-Streiber et al. 1992) und besitzen eine katalytische Aktivität, die zur kovalenten Modifizierung von Rho- und Ras-GTPasen führt (Just et al. 1995). Diese Modifizierung hat den Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts zur Folge. Trotz der gleichen katalytischen *In-vitro*-Aktivität fällt jedoch der zytopathische Effekt (CPE) auf kultivierte Zellen unterschiedlich aus. Der von TcdB (des Stammes VPI 10463) ausgelöste D-Typ CPE ist charakterisiert durch ein Abrunden der Zelle zusammen

mit dem Auftreten von ausgeprägten feinen Zellausläufern. Dadurch erhält die Zelle ein astrozyten-ähnliches Aussehen. Das Aktinzytoskelett kollabiert und die Aktinbausteine kondensieren um den Zellkern herum (Eichel-Streiber et al. 1996). Der S-Typ, ausgelöst durch das Letale Toxin (TcsL) von *C. sordellii*, ist gekennzeichnet durch das Abrunden der Zelle ohne Ausbildung von Zellausläufern. Auch hier bricht das Aktinzytoskelett zusammen, jedoch sind die Aktinmonomere in der Zellperipherie nachweisbar (Eichel-Streiber et al. 1996). Die von den übrigen LCTs ausgelösten CPE können jeweils einem der beiden Typen zugeordnet werden.

1.1.5 Molekularer Aufbau von TcdA und TcdB

TcdB und TcdA von *C. difficile* bestehen aus einer Kette, die funktionell in drei Domänen unterteilt werden kann: Die Ligandendomäne, die Translokationsdomäne und die katalytische Domäne.

- Die Ligandendomäne befindet sich am C-terminalen Ende und baut sich aus einer repetitiven Abfolge kurzer Oligopeptide (20-50 AS) (CROPS, clostridial repetitive oligopeptides) auf (Eichel-Streiber et al. 1992). In einem Kompetitions-Assay konnten rekombinante CROPs die Bindung von TcdA an die Zelloberfläche vollständig blockieren (Sauerborn et al. 1997). Ein Antikörper gegen den C-Terminus von TcdA konnte die Intoxikation inhibieren (Frey & Wilkins 1992). Untersuchungen mit TcdA zeigten außerdem, dass die vollständige Ligandendomäne für die rezeptorvermittelte Endozytose notwendig ist (Frisch et al. 2003). Dies sind Hinweise dafür, dass die spezifische Rezeptorbindung der Toxine durch die CROPs als Liganden vermittelt wird.
- Die Translokationsdomäne wird im zentralen Bereich des Toxins vermutet. Dort befindet sich eine hydrophobe Region, die in der Computeranalyse α -helikale Segmente aufweist. Die Helices sind lang genug, um eine Doppelmembran zu durchspannen (Hofmann et al. 1995), so dass angenommen wird, dass dieser Abschnitt an der Translokation der Toxine über zelluläre Wirtsmembranen beteiligt ist (Pfeifer et al. 2003).
- Die katalytische Domäne ist N-terminal lokalisiert und macht etwa ein Drittel der Toxine aus. Durch Deletionsanalysen an TcdB-10463 konnte gezeigt werden, dass die

N-terminalen 546 Aminosäuren des Toxins die volle katalytische Aktivität besitzen (Hofmann et al. 1997). Eine Verkürzung des N-terminalen Fragments auf 467 Aminosäuren führt zu einer deutlich reduzierten enzymatischen Aktivität (Wagenknecht-Wiesner et al. 1997), weitere Verkürzungen machen die Toxinbruchstücke inaktiv. Durch Vergleich mit anderen Glykosyltransferasen wurde ein hoch konserviertes Motiv (DXD) gefunden, das sich im Zentrum der katalytischen Domäne befindet. Die Veränderung dieser Sequenz bewirkt den Verlust der enzymatischen Aktivität (Busch et al. 2000, Busch et al. 1998). Es wird vermutet, dass dieses Motiv unter Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen die Bindung des Kosubstrat UDP-Glukose vermittelt (Schirmer & Aktories 2004).

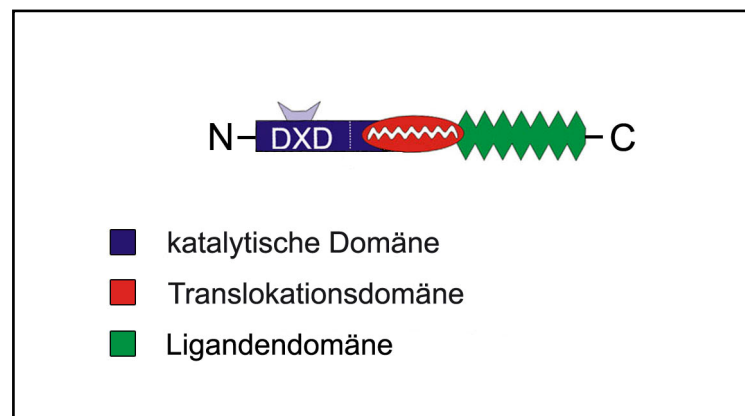


Abbildung 2: Das Drei-Domänen-Modell der LCTs

Das Bild zeigt schematisch die relative Lokalisation der katalytischen (blau), der Translokations- (rot) und der Ligandendomäne (grün).

1.1.6 Katalytische Aktivität

Alle bekannten LCTs sind Glykosyltransferasen, die monomere, kleine GTP-bindende Proteine, die auch als kleine GTPasen bezeichnet werden, glykosylieren. Als Kosubstrate dienen UDP-aktivierte Zucker.

TcdA und TcdB glykosylieren spezifisch die kleinen GTPasen der Rho-Subfamilie (Rho, Rac und Cdc42). Es handelt sich dabei um Proteine, die an einer Fülle von Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Hall 1990). Die kleinen GTPasen durchlaufen hierbei einen Zyklus zwischen inaktiver, GDP-gebundener Form, und aktiver, GTP-gebundener Form (Takai et al. 2001). Zur Aktivierung der GTPasen wird das GDP gegen GTP ausgetauscht. Katalysiert wird diese aktivierende Reaktion durch akzessorische Proteine, die „GTP Exchange Factors“ (GEF). Die Inaktivierung der GTPasen erfolgt durch Abspaltung des γ -Phosphats des GTPs. Die intrinsische GTPase-Aktivität der

kleinen GTPasen ist gering, eine andere Gruppe akzessorischer Proteine, die „GTPase activating proteins“ (GAPs) (Hall 1990) spielt für den Wechsel der GTP- zur GDP-Form eine entscheidende Rolle. GAPs steigern die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine, sie bringen einen „Argininfinger“ in die GTP-Bindungsregion ein und stabilisieren damit den Übergangszustand der Hydrolyse (Rittinger et al. 1997b, Rittinger et al. 1997a).

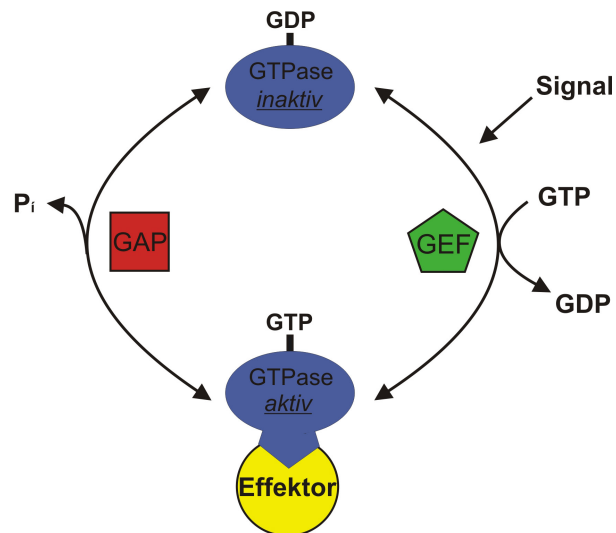


Abbildung 3: Der GTPasen-Zyklus

Die GTP-gebundene GTPase repräsentiert den aktivierten Zustand, die GDP-gebundene Form dagegen den inaktiven Zustand der Signalproteine. Auf ein Signal hin wird die inaktive GTPase mit Hilfe eines GTP exchange factors (GEF) in die aktive Form überführt. In diesem Zustand kann die GTPase mit ihren spezifischen Effektorproteinen interagieren und das Signal weiterleiten. GTPase activating proteins (GAPs) erhöhen die intrinsische GTPasen Aktivität, mit der Folge der Abspaltung des γ -Phosphats und damit der Inaktivierung der Signalproteine.

Die durch TcdA und TcdB katalysierte Monoglykosylierung erfolgt an einem Threonin (35/37) in der so genannten Switch-I-Region. Diese Region ist unter den kleinen GTPasen hoch konserviert und in die Interaktion mit den jeweiligen Effektorproteinen involviert. In Konsequenz blockiert die Monoglykosylierung die Bindung der spezifischen Effektoren (Just et al. 1995). Weitere Studien haben gezeigt, dass darüber hinaus auch die intrinsische und GAP-stimulierte GTPase-Aktivität inhibiert wird (Sehr et al. 1998). Alle angesprochenen Eingriffe in den Zyklus der GTPase-Wirkung unterbrechen die physiologische Signalweiterleitung über den Weg der monoglykosylierten GTPasen. Da Rho-GTPasen eine wichtige Rolle bei der Regulation dynamischer Prozesse des Aktinzytoskeletts spielen, lassen sich die LCT-induzierten GTPase-Modifikationen im Lichtmikroskop in Form des Zusammenbruchs des Zytoskeletts verfolgen (Eichel-Streiber et al. 1996).

1.2 Zur Aufnahme bakterieller Toxine in eukaryote Zellen

Neben den vorgenannten Clostridien, die Toxine der Familie der großen clostridialen Toxine produzieren, gibt es eine Vielzahl von weiteren Bakterien, die Proteotoxine sekretieren (Geny & Popoff 2006). Vielen bakteriellen Toxinen ist ihre Wirkung auf Zielstrukturen im Inneren eukaryoter Zellen gemein. Diese Zielstrukturen spielen in der Regel Schlüsselrollen in essentiellen zellulären Prozessen, so wie im Fall der TcdA- und TcdB- modifizierten kleinen GTPasen der Rho-Familie. Die Lokalisation der Substrate der Proteotoxine im Zytosol hat zur Folge, dass die Toxine die entsprechenden Zellkompartimente erst nach Überwindung der Barriere der Zellmembranen erreichen können. Hierfür ist die Translokation der hydrophilen Toxine über die hydrophoben Zellmembranen hinweg erforderlich - kein einfacher Weg für ein komplex gefaltetes Protein. Die Toxine haben dazu im Laufe der Evolution spezielle strukturelle Organisationen entwickelt, um zumindest für den giftigen Teil des Toxins den Weg in das Zytosol der Zelle zu bahnen (Sandvig & van Deurs 2005).

1.2.1 AB-Toxine

Innerhalb der bakteriellen Toxine haben sich Bereiche herauskristallisieren lassen, die sich auf spezielle Aufgaben in der Interaktion mit der eukaryotischen Zelle spezialisiert haben. Die strukturelle Unterteilung der AB-Toxine in zwei funktionelle Bereiche wurde erstmals 1978 von Gill beschrieben (Gill 1978). Er deklarierte die intrazellulär katalytische Domäne des Toxins als A-Bereich und den B-Bereich als den Teil, der A in das Zytosol transportiert. Bezogen auf die *C. difficile* Toxine wird die katalytische Domäne als A-Untereinheit und die Translokations- (T) und Rezeptorbindungs-Domäne (R) als B-Untereinheit bezeichnet. Entsprechend besteht der B-Bereich eigentlich aus zwei Domänen, weshalb dieser Abschnitt auch die Bezeichnung B^{RT} erhalten hat (Menetrey et al. 2005). Da Toxine nicht nur aus einer A- bzw. B-Untereinheit, sondern mehreren Untereinheiten bestehen können, hat sich als Bezeichnung der Toxine die Indizierung A_nB_m (Menetrey et al. 2005) herausgebildet, mit n bzw. m als der jeweiligen Anzahl der A- bzw. B-Teile. Für die bisher untersuchten Toxine variiert n von 1 bis 7, und m kann 1 oder 5-7 betragen. Es wird diskutiert, dass weitaus komplexere Strukturen existieren (Menetrey et al. 2005).

LCTs besitzen nach dieser Definition eine A₁B₁^{RT}-Struktur. Eine andere Einteilung hebt die repetitive Struktur der Ligandendomäne hervor und klassifiziert die LCTs als AB^x Toxine, um die Toxine von klassischen AB-Toxinen wie dem Diphtherietoxin (DT) abzugrenzen (Eichel-Streiber et al. 1996).

Weitere häufig auftretende Zusammensetzungen sind A₁B₅ und A₃B₇. In Tabelle 1 sind die bekannten Toxine dieser AB-Deklaration zugeordnet.

Tabelle 1: Auflistung von AB-Toxinen und deren strukturelle Organisation (Menetrey et al. 2005)

	Familie	Toxin	Organismus	
A₁B₁^{RT}		Diphtherietoxin	<i>C. diphtheriae</i>	
		Exotoxin A	<i>P. aeruginosa</i>	
	Clostridiale Neurotoxine		Tetanus Toxin	<i>C. tetani</i>
			Botulinum Neurotoxin A	<i>C. botulinum</i>
			Botulinum Neurotoxin B	
			Botulinum Neurotoxin C	
			Botulinum Neurotoxin D	
			Botulinum Neurotoxin E	
			Botulinum Neurotoxin F	
			Botulinum Neurotoxin G	
	LCTs		Toxin A	<i>C. difficile</i>
			Toxin B	
			Letale Toxin	<i>C. sordellii</i>
			Hämorrhagische Toxin	
		α-Toxin	<i>C. novyi</i>	
Dermonekrotische Toxine		CNF1, 2	<i>E. coli</i>	
		DNT	<i>B. pertussis</i>	
A₁B₅	Cholera Familie	Cholera Toxin	<i>V. cholerae</i>	
		Hitzelabiles Enterotoxin I, IIa, IIb	<i>E. coli</i>	
		Pertussis Toxin	<i>B. pertussis</i>	
	Shiga Familie	Shiga-like Toxine	<i>E. coli</i>	
		Shiga Toxin	<i>S. dysenteriae</i>	
A₃B₇	Anthrax Toxine	Ödem Faktor	<i>B. anthracis</i>	
		Letale Toxin		
		Protektives Antigen		
	Aktin-ADP-Ribosilierende Familie	VIP Toxin	<i>B. cereus</i>	
		Ce Toxin	<i>C. botulinum</i>	
		Iota Toxin	<i>C. perfringens</i>	
		Aktin-ADP-Ribosylierungs Toxin	<i>C. spiroform</i>	
	Aktin-ADP-Ribosylierungs Toxin	<i>C. difficile</i>		

1.2.1.1 Die Wege der Toxinaufnahme

AB-Toxine binden auf der Zelloberfläche an spezifische Rezeptoren, wodurch an der plasmamembranständigen Rezeptordomäne ein Signal ausgelöst wird, das zur Bildung von Proteinkomplexen an der Membranoberfläche führt. Im Gefolge kommt es zur Internalisierung des Toxin-Rezeptorkomplexes. Diese Internalisierung kann klathrin-abhängig oder -unabhängig erfolgen (Lord et al. 1999). Zu den Toxinen, die über klathrin-abhängige Endozytose aufgenommen werden, gehört beispielsweise das Diphtherietoxin. Dynamamin-Mangelmutanten, deren klathrin-abhängige Endozytose blockiert ist, sind deshalb nicht mehr sensibel gegenüber diesem Toxin (Simpson et al. 1998).

Klathrin-unabhängige Endozytose, wie im Fall des Cholera-Toxins, findet demgegenüber über cholesterolreiche Membrandomänen, die Calveoli, statt (Orlandi & Fishman 1998). Obwohl klar ist, dass die Endozytose ein notwendiger Bestandteil der Wirkung für die meisten Toxine ist, bleibt für viele Toxine unklar, über welchen speziellen Mechanismus ihr Endozytoseprozess abläuft (Falnes & Sandvig 2000).

1.2.1.1.1 Prozessierung über Endosomen

Unabhängig vom Endozytosetyp gelangen alle Toxine zunächst in frühe Endosomen. Endosomen besitzen aufgrund einer membranassoziierten Protonenpumpe einen niedrigen pH-Wert. Das saure Milieu ist u.a. notwendig, um die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor zu lösen. Einkettige Toxine haben diesen pH-Wert für sich genutzt. Der niedrige pH-Wert löst bei ihnen eine Konformationsänderung aus, die hydrophobe Regionen des Toxins freilegt und die Toxininsertion in die Endosomenmembran zur Folge hat (Sandvig & van Deurs 2005).

Sehr gut erforscht ist die Zellaufnahme für das Beispiel des Diphtherietoxins. Das Diphtherietoxin besitzt eine $A_1B_1^{RT}$ -Organisation. Die B^R -Komponente, die dem C-terminalen Bereich des Toxins entspricht, besitzt zehn β -Stränge, die zwei β -Faltblätter bilden und für die Rezeptorbindung zuständig sind. Die B^T -Komponente besteht aus neun α -Helices, von denen zwei eine ungewöhnlich hohe Hydrophobizität besitzen (Chenal et al. 2002, Collier 1975).



Abbildung 4: Die 3D-Struktur des Diphtherietoxins

Das Diphtherie-Toxin ist aus einer A-Komponente (pink), einer B^T-Komponente (hellblau) und einer B^R-Komponente (dunkelblau) aufgebaut (Menetrey et al. 2005).

Das saure Milieu der Endosomen führt zu einer partiellen Entfaltung des Proteins und Exposition der beiden hydrophoben α -Helices, die danach eine α -Pore ausbilden (Silverman et al. 1994). Diese Pore spielt bei der Entfaltung der katalytischen A-Einheit des Toxins und deren Translokation in das Zytosol eine wesentliche Rolle (Oh et al. 1999, Zhan et al. 1994).

Der niedrige pH-Wert hat folglich eine entscheidende Bedeutung für die Funktion des DT. Deutlich wird dies auch durch die Gabe von Bafilomycin A, das die Protonen-ATPase-Pumpe, und somit die Ansäuerung der Endosomen blockiert, mit der Folge, dass die Konformationsänderung des Toxins und die Translokation der katalytischen Domäne in das Zytoplasma ausbleiben.

1.2.1.1.2 Prozessierung über den Golgi-Apparat

Bei einigen Toxinen wird die zytotoxische Wirkung durch Bafilomycin jedoch nicht inhibiert. Diese Toxine gelangen nicht über die Membran früher Endosomen in das Zytosol, sondern durchlaufen den retrograden Weg von frühen Endosomen über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER). Durch Brefeldin A, eine Substanz, die den Golgi-Apparat zerstört, können Zellen vor der Wirkung dieser Toxine geschützt werden (Sandvig & van Deurs 1996). Toxine, die über frühe Endosomen ins Zytosol translozieren, lassen sich durch diese Substanz dementsprechend nicht blockieren. Der retrograde Transport vom Golgi-Apparat zum ER hängt in vielen Fällen von einer C-terminalen KDEL-Sequenz oder einer entsprechenden Tetrapeptidfolge ab. Dieses

Signal ist ein Rücksendesignal für eukaryotische Proteine, die im ER verbleiben und nicht vom Golgi-Apparat aus sezerniert werden sollen (Munro & Pelham 1987, Miesenbock & Rothman 1995). Die KDEL-Sequenz bindet spezifisch an KDEL-Rezeptoren, die über den gesamten Golgi-Apparat verteilt vorkommen und den retrograden Transport zum ER vermitteln (Miesenbock & Rothman 1995). Cholera-Toxin ist eines der Toxine, das diese KDEL-Sequenz an seinem C-Terminus trägt und für eine optimale Aktivität benötigt; dies beweisen Mutationsstudien (Lencer et al. 1995). Das Entfernen der KDEL-Sequenz des Pseudomonas Exotoxin A beispielsweise inhibiert dessen Zytotoxizität gänzlich (Chaudhary et al. 1990). Anderen Toxinen, die auch über das ER transportiert werden, wie das Shiga-Toxin, fehlt diese Sequenz allerdings vollständig. Hier müssen andere Mechanismen den Golgi-ER-Transport ermöglichen, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten (Jackson et al. 1999, Lord et al. 1999).

1.2.1.1.3 Der Translokationsschritt

Wie im Detail die Translokation der katalytischen A-Domänen der Toxine ins Zytosol erfolgt, ist in weiten Teilen noch nicht bekannt. Einige Toxine haben auch hier die Möglichkeit Poren zu bilden, obwohl nicht klar ist, ob sie bei der Translokation beteiligt sind. Das Cholera-Toxin beispielsweise hat eine A₁B₅-Organisation mit fünf identischen B-Untereinheiten, die jeweils aus zwei dreisträngigen antiparallelen β -Faltblättern und einer amphipathischen α -Helix bestehen. Die β -Faltblätter bilden ein Pentagon mit einem Loch in der Mitte, das von den fünf α -Helices ausgekleidet wird (Zhang et al. 1995).

Ein weiterer mit der Translokation in Verbindung gebrachter Mechanismus ist der Transport von nicht korrekt gefalteten Proteinen aus dem ER ins Zytosol, bei dem fehlerhafte Proteine durch Proteosomen abgebaut werden (Wiertz et al. 1996, Plemper et al. 1997). Die hierfür verantwortlichen Kanäle werden durch das Sec61-Protein gebildet und deshalb Sec61p-Translocons genannt. Das Cholera-Toxin und das Pseudomonas Exotoxin A wurden assoziiert mit Sec61p-Komplexen aufgefunden (Koopmann et al. 2000, Schmitz et al. 2000). Es wird postuliert, dass die Toxine sich als Substrate dieses Transportweges maskieren, indem Chaperone des ER die Toxine partiell entfalten und dadurch den Transport über die Sec61p-Kanäle ermöglichen. Des Weiteren besitzen AB-Toxine, die den ER-Weg nutzen, nur sehr wenige bzw. keine Lysine in den A-Untereinheiten (Hazes & Read 1997). Die Markierung mit Ubiquitin ist der erste Schritt

zum Abbau einiger Proteine. Für diese Reaktion werden ϵ -Aminogruppen von Lysin genutzt. Dementsprechend lässt sich das Fehlen von Lysinen in der A-Domäne als Schutz der katalytischen Fragmente vor diesem physiologischen Weg der Proteindegradation interpretieren (Hazes & Read 1997).

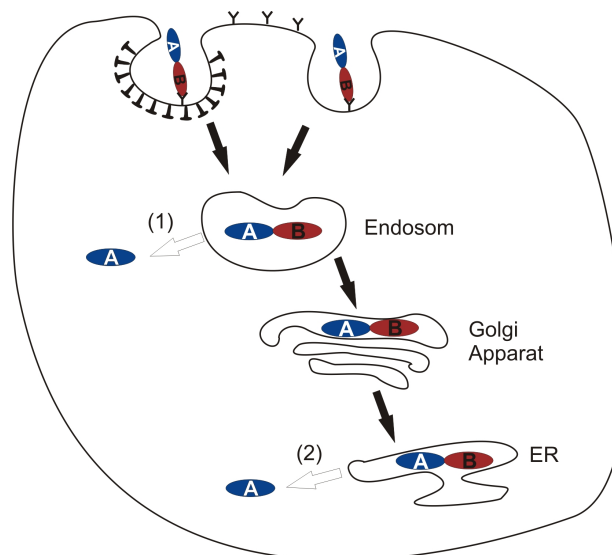


Abbildung 5: Schematische Darstellung des intrazellulären Transports von AB-Toxinen

AB-Toxine binden an einen Zelloberflächenrezeptor (Y) und werden durch klathrin-abhängige (T) und -unabhängige Endozytose aufgenommen. Die A-Domäne der AB-Toxine werden entweder (1) direkt ausgehend von frühen Endosomen ins Zytosol transloziert oder (2) die Toxine werden über den Golgi-Apparat zum ER transportiert und die A-Domäne tritt hier in das Zytosol ein.

1.2.1.2 Abspaltung der katalytischen A-Domäne

Unabhängig vom Aufnahmeweg der Toxine ist die katalytisch-toxische A-Untereinheit nach Translokation der A-Domäne über die Membran noch nicht ins Zytosol freigesetzt. Für diesen Schritt ist die finale Abtrennung der A-Untereinheit von der B-Untereinheit notwendig. Dazu haben sich im Laufe der Evolution mehrere Mechanismen herausgebildet.

Das Toxin kann von dem produzierenden Bakterium selbst oder mit Hilfe spezifischer Proteasen der Wirtszelle gespalten werden (Gordon & Leppla 1994). Ergebnisse, die für AB-Toxine erhoben worden sind, werden in der Diskussion im Vergleich mit den für *C. difficile* erhobenen neuen Daten der vorliegenden Arbeit diskutiert (s. Diskussion).

1.2.1.3 Aufnahme und Prozessierung der *C. difficile* Toxine A und B

Die *C. difficile* Toxine A und B sind nach der Definition von Menetry et al. (2005) A₁B₁^{RT}-Toxine, die über rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen werden. Das Wissen über die entsprechenden zellulären Rezeptoren ist noch sehr limitiert. Für TcdA konnten die Zuckerstrukturen Galα1-3Galβ1-4GlcNAc (Tucker & Wilkins 1991) und GalNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAc (Karlsson 1995) identifiziert werden. Der verantwortliche TcdA-Rezeptor im humanen Kolon ist bis jetzt ebenso unbekannt wie die TcdB spezifischen Rezeptorstrukturen. Frühe Versuche ließen darauf schließen, dass der TcdB-Rezeptor ebenfalls Kohlenhydratstrukturen besitzt (Lyerly et al. 1988), eine Bestätigung und Präzisierung dieser Daten steht jedoch noch aus.

Die Internalisierung der Toxine erfolgt über klathrin-abhängige Endozytose, wie Versuche mit goldmarkierten Toxinen zeigten (Kushnaryov & Sedmak 1989, Eichel-Streiber et al. 1991). Einzelne Schritte des Aufnahmeprozesses wurden in erster Linie mit TcdB aufgeklärt. Demnach wird TcdB über frühe Endosomen in das Zytosol transloziert, lysosomotrophe Inhibitoren wie Bafilomycin blockieren den zytotoxischen Effekt von TcdB (Florin & Thelestam 1983, Florin & Thelestam 1986, Henriques et al. 1987). Die extrazelluläre Ansäuerung auf einen pH von <5,2 induziert die Aufnahme von TcdB in das Zytosol und das auch in Gegenwart von Bafilomycin A. TcdB kann durch die extrazelluläre Ansäuerung direkt über die Zellmembran ins Zytosol translozieren und macht die Notwendigkeit der endosomalen Ansäuerung für die Zellaufnahme deutlich, wie sie auch für andere AB-Toxine bekannt ist (Qa'Dan et al. 2000).

Der Translokationsprozess selber scheint auf ähnliche Weise wie die Translokation des Diphtherietoxins zu erfolgen. Durch den niedrigen pH-Wert im Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu einer reversiblen erhöhten Hydrophobizität führt und dem Toxin die Interaktion mit der endosomalen Membran erlaubt (Qa'Dan et al. 2000). Nachfolgend kommt es zur Ausbildung einer Pore, die *in vitro* durch ⁸⁶Rb⁺-Efflux intakter Zellen bei niedrigem pH-Wert demonstriert wurde (Barth et al. 2001). Sowohl das Holotoxin TcdB als auch ein Fragment aus der Translokations- und Rezeptorbindungsdomäne ist zur Bildung von Poren in „Chinese Hamster Ovary Cells“ fähig. Die Porenbildung wurde bei künstlichen Lipid-Bilayern beobachtet (Frisch et al. 2003). Unklar ist allerdings noch, wie der Mechanismus der Toxintranslokation über die Membran im Detail erfolgt und welche Rolle die Kanalbildung dabei spielt.

Im weiteren Verlauf der Aufnahme in die Zelle wurde gezeigt, dass bei TcdB eine Abspaltung des A-Teils vom B-Teil des AB-Toxins stattfindet. Die B-Untereinheit, bestehend aus der Rezeptor- und Translokationsdomäne (AS 547-2366), verbleibt im Endosom, wohingegen das N-terminale katalytische A-Fragment ins Zytosol transloziert wird (Pfeifer et al. 2003).

Kürzlich konnte diese proteolytische Spaltung von TcdB experimentell visualisiert werden. TcdB wurde fluoreszenzmarkiert, mit Zellfraktionen inkubiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Dokumentation im Fluoreszenzimager zeigte, dass zusätzlich zum Toxin zwei fluoreszierende Spaltfragmente auftreten. Zu sehen waren das Holotoxin mit 270 kDa, ein ca. 207 kDa großes Fragment und ein Fragment von ca. 63 kDa (Rupnik et al. 2005).

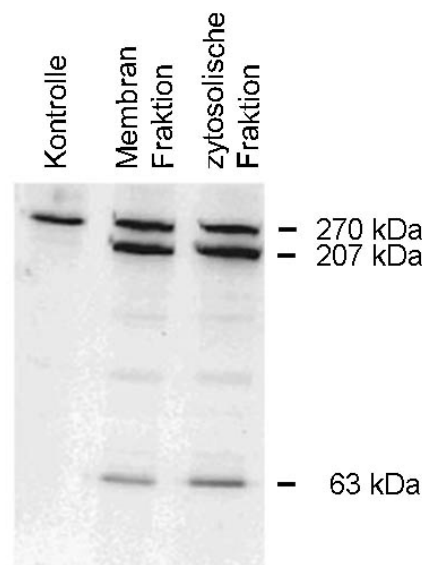


Abbildung 6: TcdB Spaltungsassay

Phosphorimagerbild von fluoreszenzmarkiertem TcdB (10463) nach Inkubation mit der Membran- bzw. zytosolischen Fraktion von Verozell-Lysat. Kontrolle ohne Zellfraktion. Das Holotoxin (270 kDa) wird in 2 Fragmente gespalten: A-Untereinheit (63 kDa), B-Untereinheit (207 kDa). Ohne Zellfraktion findet keine Spaltung statt (entnommen aus (Rupnik et al. 2005)).

Immunoblotting und Proteinsequenzierung identifizierten diese Fragmente als Rezeptorbindungs-/Translokationsdomäne (207 kDa) und katalytische Domäne (63 kDa) (Rupnik et al. 2005).

Das abgespaltene 63 kDa-Fragment hat extrazellulär appliziert keine Zytotoxizität (Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005). Wird es jedoch in die Zelle injiziert, so entsteht der typische zytopathische Effekt (Rupnik et al. 2005). Dies spiegelt den Charakter der AB-Toxine wider; die katalytische A-Domäne kann, wie zu erwarten, ohne die für die Rezeptorbindung und Translokation verantwortliche B-Domäne nicht mehr in die Zelle gelangen.

Auch Fusionsproteine aus der A-Untereinheit mit Teilen anderer Toxine unterstützen diese Aussage. Die N-terminalen 555 Aminosäuren von TcdB wurden mit dem Letale Toxin von *B. anthracis* (LT) fusioniert. Das Fusionsprotein war enzymatisch aktiv, für Zellen zytotoxisch und verursachte im Tiermodell die typischen Effekte von Wildtyp TcdB (Saiardi et al. 2004, Spyres et al. 2001, Spyres et al. 2003). Die A-Domäne des TcdB konnte folglich mit Hilfe des Anthrax-Transport-Proteins in die Zelle gelangen und ins Zyto-plasma transloziert werden.

Untersuchungen zeigten, dass die N-terminalen 546 Aminosäuren für die katalytische Aktivität von TcdB essentiell sind, die Glykosyltransferaseaktivität wurde in diesem Bereich lokalisiert (Hofmann et al. 1997). Die Identifikation der Spaltstelle von TcdB (Rupnik et al. 2005) bestätigte diese Experimente, denn das TcdB des Stammes 10463 wird zwischen Leucin₅₄₃ und Glycin₅₄₄ gespalten und die Spaltstelle von TcdB des Stammes 8864 liegt zwischen Leu₅₄₄ und Gly₅₄₅. Die Spaltstelle liegt in einem hoch konservierten Bereich (Rupnik et al. 2005). Es ist bekannt, dass Aminosäuren nahe der Spaltstelle die Spaltreaktion beeinflussen können (Molloy et al. 1992), so auch bei TcdB. Dabei wird TcdB 8864 etwas schneller gespalten als TcdB 10463. Die Aminosäure-Sequenz um die Schnittstelle unterscheidet sich dennoch nur in der Aminosäure in Position -2:

TcdB 10463 (EGSL/GEDD)

TcdB 8864 (EGAL/GEDD).

Insbesondere die Arbeiten von Pfeifer et al. und Rupnik et al. führten zur Hypothese, dass eine Protease der Zelle zur Abspaltung des katalytischen A-Fragments der LCTs führt. Einer autoproteolytischen Spaltung der Toxine war hingegen deutlich widersprochen worden (Pfeifer et al. 2003). Die Protease der Zelle zu identifizieren, die die LCTs spaltet, war Ziel der vorliegenden Arbeit.

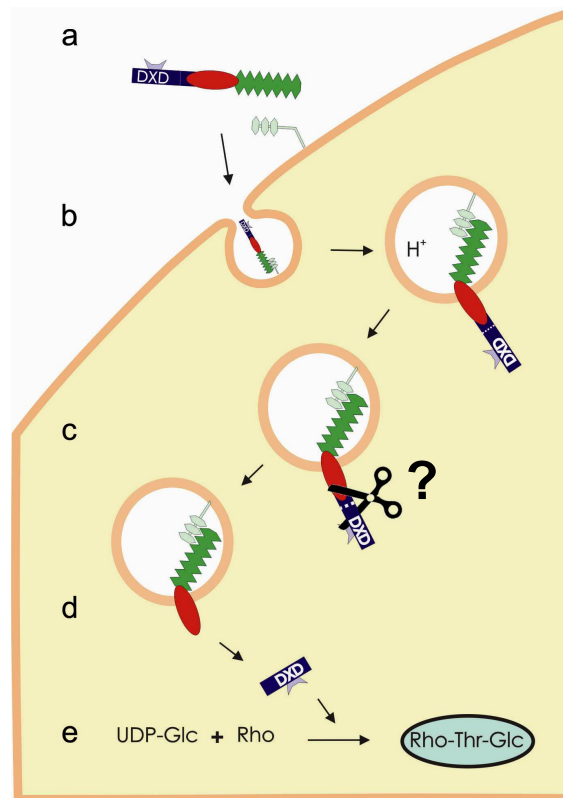


Abbildung 7: Die Prozessierung von Toxin B in der Zelle

Das Schema stellt in a bis e die Prozesse dar, die für die zelluläre toxische Wirkung des Toxins notwendig sind: a) die Interaktion des Toxins mit dem spezifischen Rezeptor induziert die rezeptorvermittelte-Endozytose; b) die Ansäuerung in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung und Insertion des Toxins in die endosomale Membran mit Ausbildung einer Pore; c) die katalytische A-Untereinheit transloziert ins Zytosol und interagiert dort mit einer von Rupnik et al. (2005) vorhergesagten bisher noch unbekanntten Protease (Schere); d) diese hypothetische Protease katalysiert die proteolytische Spaltung und setzt das katalytische Fragment ins Zytosol frei; e) Glykosylierung der GTPasen (hier Rho) durch das N-terminale 63 kDa- Fragment und den Kofaktor UDP-Glukose (UDP-Glc) gefolgt von der Disaggregation des Zytoskeletts und schließlich dem Zelltod (gemäß Eichel-Streiber et al. 1996)

2 Fragestellung

Clostridium difficile ist einer der bedeutendsten nosokomialen Keime der industrialisierten Welt (Riley 1998) mit stetig steigender Inzidenz (Loo et al. 2005). Symptome der Erkrankung sind banale Durchfälle oder aber das schwere Krankheitsbild der Pseudomembranösen Kolitis, beides in der Regel als Folge von Antibiotikatherapien. Das Auftreten hochvirulenter *C. difficile* Stämme wurde im Jahr 2005 in Kanada und den USA (Loo et al. 2005, McDonald et al. 2005) und 2006 in der EU berichtet (Kuijper et al. 2006). Ergebnisse von Rupnik et al. (2005) hatten zur Hypothese geführt, dass die beiden Toxine A und B (TcdA & TcdB) durch eine Protease des Zellzytosols aktiviert werden. Nach Experimenten von Pfeifer et al. (2003) war dabei ein autoproteolytischer Prozess ausgeschlossen und gezeigt worden, dass allein die katalytische A-Untereinheit ins Zellinnere vordringt und dort die zytotoxische Leistung hervorruft.

In der vorliegenden Arbeit sollte die zelluläre Protease gefunden und deren Wirkung charakterisiert werden. Grundlage für die Isolierung dieser Protease war die Nutzung des von Rupnik et al. (Rupnik et al. 2005) beschriebenen Spaltungsassays mit fluoreszenzmarkiertem Toxin B, mit dem Ziel, die spaltende Aktivität zu identifizieren. Im Einzelnen sollten folgende Ziele bearbeitet werden:

- Optimierung des Spaltungsassays nach Verbesserung der Toxinmarkierung
- Testung geeigneter Zell- und/oder Organextrakte auf die Effizienz ihrer proteolytischen Wirkung
- Aufreinigung und Isolierung der Toxin B-spaltenden Protease aus den Extrakten durch Einsatz hochauflösender Chromatographieverfahren
- Einsatz massenspektrometrischer Verfahren zur Identifizierung der Protease
- Klonierung, Charakterisierung und transgene Expression der zellulären Protease

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten das molekulare Verständnis der Funktion der Toxine TcdA und TcdB vervollständigen und damit zur Klärung der Frage beitragen, worin die besondere Gefahr der seit kurzem auftretenden neuen Stämme besteht. Die Kenntnis der zu charakterisierenden Proteaseaktivität könnte im Idealfall genutzt werden, um die molekularen Mechanismen der *C. difficile* Intoxikation, wie es im Fall von HIV-Infektionen schon länger Praxis ist, durch Einsatz von Proteaseinhibitoren gezielt zu blockieren. Solche Therapieformen könnten innovative Wege zur antibiotikafreien Behandlung aller *C. difficile* Erkrankungen erschließen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Substanzen wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka/Neu-Ulm, Merck/Darmstadt, Roth/Karlsruhe und Sigma/Deisenhofen bezogen.

Die für die Zellkultur benötigten Reagenzien und Medien wurden von PAA/Cölbe gekauft und das Verbrauchsmaterial von Greiner/Frickenhäuser.

Die *C. difficile* Toxine A und B, sowie das *C. novyi* α -Toxin wurden von tgcBIOMICS, Mainz zur Verfügung gestellt.

Das *C. sordellii* Toxin TcsL wurde uns freundlicherweise von M. Popoff vom Institute Pasteur überlassen.

Schweine-Milzen wurden von der Domäne Mechtildshausen/Wiesbaden bezogen.

Azetonitril	Roth, Karlsruhe
Cy3-NHS-Ester	GE-Healthcare, Freiburg
Enzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
EPNP	Acros Organics, Belgien
Dithiotreitol	Sigma, Deisenhofen
HiTrap NHS Sepharose HP	GE-Healthcare, Freiburg
HiPrep DEAE FF HR 16/10	GE-Healthcare, Freiburg
Inositolphosphate	Cayman Chemical, USA und Sigma, Deisenhofen
Iodacetamid	Sigma, Deisenhofen
Mono Q HR 5/50 GL	GE-Healthcare, Freiburg
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Resource Q 6ml	GE-Healthcare, Freiburg
Sephacryl S-100 HR 26/60	GE-Healthcare, Freiburg
Superdex 75 HR 10/300 GL	GE-Healthcare, Freiburg
Trypsin Gold sequencing grade	Promega, Mannheim
Wasser LC-MS Grade	Roth, Karlsruhe
Zeba Desalt Spin Columns	Pierce, USA
Zink-Färbelösung	Biorad, München

3.1.2 Geräte

Äkta Purifier HPLC-System	GE-Healthcare, Freiburg
Brutschränke	Hereaus, Hanau
Elektrophoreseapparatur für SDS-PAGE	Keutz, Reiskirchen
Eppendorf Micromanipulator 5170	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg
GelDoc EQ System Image Reader	Biorad, München
Heizblock 5230	Eppendorf, Hamburg
Herafreeze -70 °C	Hereaus, Hanau
Kunststoffmaterial für den Laborbedarf	Greiner, Frickenhausen; Falcon, Becton & Dickinson, Heidelberg
Laborzentrifuge RC5B	Sorvall, Wilmington, USA
Lyophylle	Leybold-Heraeus, Hanau
Leitz DM-IRB Phasenkontrast-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Minifuge RF	Hereaus, Hanau
Powersupplies	GE-Healthcare, Freiburg
pH-Messgerät	Schott, Hofheim
Pipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Q-TOF Premier	Waters, Milford, USA
Schwenkplattform	Technomara, Zürich, Schweiz
Speed Vac mit Kühlfalle und Vakuumpumpe	Savant, Farmingdale, USA
Sterilwerkbank	Flow, Meckenheim
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall: Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gemünd
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann & Coulter, Krefeld
VisiChrome High Speed Fluorescence	
Polychromatorsystem	Visitron Systems, Puchheim
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen	Sartorius, Göttingen

3.1.3 Zelllinien

- T2-Zellen

T2 ist ein humaner somatischer Zellhybrid aus der B-lymphoblastoid-Zelllinie B-LCL 721.174 und der 8-Azaguanin und ouabain-resistenten Variante T-LCL CEM (CEM[R].3). Es handelt sich um Suspensionszellen (ACC 598) (Salter & Cresswell 1986).

- IHKE-Zellen

IHKE (**I**mmortalized **H**uman **K**idney **E**pithelial Cells) ist eine immortalisierte humane proximale Tubuluszelllinie, die adhären wächst. Entwickelt wurde sie von Dr. Steen Mollerup (Department of Toxicology, National Institute of Occupational Health, Oslo, Norwegen).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von T2-Zellen

Kulturmedium: DMEM mit 10% FCS (FCS Gold; PAA, Cölbe)

T2 Zellen wurden in Kulturflaschen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (10 %) bei 37 °C kultiviert. Die Viabilität der Zellen wurde kontrolliert und davon abhängig die Kulturen alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen bei 300 g abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 in eine neue Kulturflasche überführt. Zur quantitativen Anzucht wurden Rollerflaschen verwendet.

3.2.2 Kultivierung von IHKE-Zellen

Kulturmedium: DMEM/HAM's F12 (1:1) mit 10 % FCS (FCS Gold; PAA, Cölbe)

IHKE-Zellen wurden in Kulturflaschen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank (10 %) bei 37 °C kultiviert. Die Zelllinie wurde alle 2-3 Tage mechanisch von der Wachstumsfläche abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 in eine neue Kulturflasche überführt.

3.2.3 Kryokonservierung

3.2.3.1 Einfrieren

Alle verwendeten Zellen wurden wie folgt kryokonserviert. Die jeweiligen Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge 5415), der Überstand abgenommen und das Pellet anschließend in 1ml FCS + 10 % DMSO resuspendiert. Danach wurden die Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert (1 ml) und für 2 Tage bei -80 °C gelagert. Für eine langfristige Aufbewahrung wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.3.2 Auftauen

Beim Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden die Kryoröhrchen unter leichtem Schütteln bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut und rasch in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO wurde durch tropfenweise Zugabe von ca. 5 ml 37 °C warmen Kulturmediums verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge 5415) zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die gelösten Zellen in sterilen Kulturgefäßen in Kultur genommen.

3.2.4 Herstellung von Milzzellextrakt

Schweine-Milzen wurden von einem lokalen Schlachthaus zur Verfügung gestellt. Die Milzen wurden in kleine Stücke geschnitten und durch den Fleischwolf gedreht. Diese Rohmasse wurde in eisgekühltem PBS suspendiert, so dass sich die Lymphoblasten aus dem Gewebe lösen. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (bei 300 g) und das Zellpellet in dem Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Durch diese Behandlung werden die in dem Pellet enthaltenen Erythrozyten lysiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 10 mM Tris-HCl pH 8,5. Das erhaltene Pellet wurde darauf folgend sofort aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurden Aliquots langsam aufgetaut und 1:1 mit 10 mM Tris-HCl pH 8,5 versetzt. Die anschließende Homogenisierung im Potter-Elvehjem (20 Hübe bei 1000 rpm) erfolgte unter Eiskühlung. Das Lysat wurde schließlich für 1 h bei 200.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verwendet.

Niedrigsalzpuffer: 150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH 7,6

PBS: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ ad 1000 ml H₂O_{dest.}; pH 7,4

3.2.5 Mikroinjektion

Die Mikroinjektionsversuche wurden mit IHKE-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht auf 35 mm Petrischalen mit Glasboden gezüchtet und dann für die Experimente verwendet. Unmodifiziertes oder EPNP-modifiziertes Toxin B wurde in Intrazellulär-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Der Intrazellulär-Puffer enthielt Fluoreszein-Isothiozyanat-markiertes-Dextran (FITC-Dextran, 100 mg ml⁻¹ Sigma, Deisenhofen), um die erfolgreich mikroinjizierten Zellen zu markieren. Die Mikroinjektion wurde mit einem Eppendorf Mikromanipulator 5170 und Mikroinjektor 5242 (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Der Injektionspuls von 120 hPa wurde für 0,3 s appliziert. Die Effekte auf die Zellen wurden zu mehreren Zeitpunkten mit einem Invert-Phasen-Kontrast-Mikroskop (Leitz DM-IRB, Leica Systems, Wetzlar) ausgestattet mit einem Visitron „VisiChrome High Speed Fluorescence Polychromatorsystem“ (Visitron Systems, Puchheim) fotografiert. Die Excitations- und Emissions-Wellenlängen waren 490 bzw. 525 nm.

Intrazellulärpuffer: 145 mM Kalium-Glutamat, 20 mM NaCl, pH 7,3

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt.

Bei der Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 10 %-igen Trenngel aufgetrennt. Es wurden dabei vertikale Minigel-Elektrophoresekammern von Keutz (Keutz, Reiskirchen) verwendet.

Die Glasplatten und Spacer wurden mit 96 % Ethanol abgerieben, zusammengebaut und die Minigelapparatur vervollständigt. Die Trenngellösung wurde mit Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,001 %) versetzt und zwischen die Glasplatten gegossen. Die Gelmatrix wurde anschließend vorsichtig mit Butanol-1 überschichtet, um das System sauerstofffrei zu halten und die Oberfläche zu glätten. Nach der Polymerisation wurde das Butanol-1 vollständig entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Sammelgellösung wurde ebenfalls mit Ammoniumpersulfat (Endkonzentration 0,05 %) und TEMED (Endkonzentration 0,001 %) versetzt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und der Auftragskamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurden der Auftragskamm entfernt, die Taschen mit H₂O_{dest} ausgewaschen und die Elektrophoresekammer mit SDS-PAGE-Puffer gefüllt.

Die Proben wurden mit 2fach konzentriertem Laemmli-Ladepuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120 V für 1-2 Stunden.

Acrylamidstocklösung: 30 % Acrylamid-, 0,8 % Bisacrylamid-Lösung

Sammelgellösung: 125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1 % (w/v) SDS; 1:7,2 Verdünnung der Acrylamidstocklösung

Trenngellösung: 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS; Acrylamidstocklösung in entsprechender Verdünnung

Laemmli-Ladepuffer: 4 % (w/v) SDS; 375 mM Tris-HCl (pH 6,8); 12,5 (v/v) Glycerin; eine Spatelspitze Bromphenolblau; 5 % (w/v) β-Mercaptoethanol

SDS-PAGE-Puffer: 0,6 % (w/v) Tris; 2,88 % (w/v) Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

3.3.2 Zink-Proteinfärbung

Die Zink-Färbung von SDS-Gelen (Fernandez-Patron et al. 1995) wurde mit dem „Zinc Stain und Destain Kit“ von Biorad, München durchgeführt. Das Gel wurde für 10 min auf einem Schüttler mit 50 ml einer 1:10-Verdünnung der Imidazol-Lösung A inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einen Behälter mit 50 ml einer 1:10-Verdünnung der Zinksulfat-Lösung B überführt und für 1 min inkubiert. Die Proteinbanden werden durch eine Negativfärbung sichtbar. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit H₂O_{dest}. Die Dokumentation der Gele wurde mit dem GelDoc EQ System Image Reader (Biorad, München) durchgeführt.

3.3.3 Deep Purple Total Protein Stain

Das Gel wurde von den Glasplatten befreit und in einen Behälter mit Fixierungslösung überführt, um es für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler zu inkubieren. Das Gel wurde anschließend in einen Behälter mit Waschlösung überführt und dort für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Anschließend wurde die Waschlösung entfernt und durch H₂O_{dest} ersetzt. In das Wasser wurde Deep Purple Total Protein Stain (GE-Healthcare, Freiburg) zugegeben, so dass eine 1:200-Verdünnung entstand. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Deep Purple-Lösung wurde nun entfernt und das Gel mit 7,5 % Essigsäure für 15 min im Dunkeln gewaschen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das Gel war dann bereit für die Dokumentation im GelDoc EQ System Image Reader (Biorad, München) mit dem Emissions-Filter 560DF50 (Biorad, München).

3.3.4 Modifikation von Toxinen

3.3.4.1 Kopplung von Cy3 an Toxin A und B

Die Toxine des *C. difficile* Stammes VPI10463 wurden von tgcBIOMICS (Mainz) bezogen. 100 µg des Toxins wurden auf 0,1 M NaHCO₃ pH 8,5 mit Hilfe der Zeba Desalt Spin Column (Pierce, USA) umgepuffert. Anschließend wurden 2,2 µl Cy3-NHS-Ester (GE-Healthcare, Freiburg; 0,1 mg/ml) zugefügt und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 22 °C im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde exakt nach einer Stunde durch das Umpuffern auf 10 mM Tris pH 8 mit Hilfe der Zeba Desalt Spin Column gestoppt. Anschließend wurden Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.3.4.2 EPNP-Modifizierung von Toxin B

Toxin B wurde mit Hilfe von Zeba Desalt Spin Columns (Pierce, USA) auf einen Puffer bestehend aus: 250 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 500 µM DTT, 5 % DMSO, pH 5,5 umgepuffert. EPNP (Acros Organics, Belgien), gelöst in einem Methanol/Cyclodextran-Gemisch (1:1), wurde dem Toxin in einer Endkonzentration von

10 mM zugesetzt und für 30 h bei 500 rpm auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Reaktionsgemisch wurde schließlich auf 40 mM HEPES pH 7,5 umgepuffert (Zeba Desalt Spin Columns, Pierce, USA) und in die Experimente eingesetzt.

3.3.5 Spaltungsassay

Der Spaltungsassay wurde durchgeführt wie bereits veröffentlicht (Rupnik et al. 2005). Die Reaktion wurde in 10 mM Tris-HCl pH 8,5 durchgeführt und erfolgte in einem Endvolumen von 10 μ l. Es wurden entweder 500 ng Cy3-markiertes Toxin oder 1 μ g unmarkiertes Toxin verwendet. Wurden Zellextrakte oder HPLC-Fractionen getestet, so wurden 3 μ l markiertes Toxin eingesetzt. Inositolphosphate oder andere Chemikalien wurden in den entsprechenden Endkonzentrationen eingesetzt. Nach 1 h bzw. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Ladepuffer gestoppt und die Proteine im SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Die Visualisierung der Toxin-Banden erfolgte entweder über die Cy3-Fluoreszenz oder Zink-Proteinfärbung. Die Cy3-Fluoreszenz wurde im GelDoc EQ System Image Reader (Biorad, München) mit dem Emissions-Filter 560DF50 (Biorad, München) dokumentiert.

3.3.6 HPLC-Aufreinigung

3.3.6.1 HPLC-Aufreinigung von Milzellextrakt

Milzellextrakt wurde für 10 min auf 96 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gekühlt. Der Extrakt wurde dann für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,22 μ m Spritzenfilter (Millipore, Eschborn) filtriert. Die HPLC-Aufreinigungen wurden mit einem Äkta Purifier (GE-Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Alle Schritte wurden bei 6°C verrichtet. Im ersten Schritt wurde eine HiPrep DEAE FF HR 16/10 (GE Healthcare) Anionenaustauscher-Säule genutzt mit einem Gradienten von 3-25 % Puffer B in neun Säulenvolumen bei 5 ml/min. Die Fraktionen wurden anschließend im Spaltungsassay getestet und spaltung-induzierende Fraktionen auf einem Resource Q-Anionenaustauscher (6 ml, GE-Healthcare, Freiburg) geladen. Mit einem Gradienten von 19-35 % Puffer B in zwei Säulenvolumen bei 1 ml/min wurden die Substanzen wieder eluiert. Die Fraktionen mit Aktivität wurden zusammengeführt, lyophilisiert und für die Auftrennung

mit der Sephacryl S100 HR 26/60 Gelfiltrations-Säule (GE Healthcare, Freiburg) in 3 ml H₂O_{dest} aufgenommen. Die Gelfiltration wurde mit 5 % Puffer B mit 1 ml/min durchgeführt. Die oben beschriebene Reinigung wurde nachfolgend mit weiteren 100 ml Aliquots Milzzellextrakt durchgeführt und alle so gereinigten aktiven Fraktionen vereinigt. Der anschließende Anionenaustausch wurde auf einer Mono Q HR5/50-Säule (GE-Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die Fraktionen wurden mit einem Gradienten von 20-35 % Puffer B in 36 Säulenvolumen mit 1 ml/min gewonnen. Im Spaltungsassay aktive Fraktionen wurden anschließend erneut über den Mono Q-Anionenaustauscher (GE-Healthcare, Freiburg) aufgereinigt, allerdings mit einem Gradienten von 20-35 % Puffer B in 30 Säulenvolumen mit 1 ml/min. Die im Spaltungsassay aktiven Fraktionen wurden zusammengeführt, lyophilisiert, in 250 µl H₂O_{dest} aufgenommen und über eine Superdex S75 Gelfiltrations-Säule (HR 10/300, GE-Healthcare, Freiburg) aufgetrennt. Dieser Lauf wurde mit 100 mM Ammoniumacetat pH 7,5 bei 1 ml/min durchgeführt; ein Puffer, der flüchtig ist und vollständig einlyophilisiert werden kann. Aktive Fraktionen wurden lyophilisiert und für weitere Analysen verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Puffer A: 10 mM Tris-HCl; pH 8.5

Puffer B: 10 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; pH 8.5

3.3.6.2 Affinitätsreinigung von Toxin B

Für die Affinitätsreinigung des TcdB wurde der Toxin B spezifische Antikörper 2CV an eine HiTrap NHS Sepharose-Säule (GE-Healthcare, Freiburg) gekoppelt. Anschließend wurden 4 mg der Toxin B-Präparation (tgcBIOMICS, Mainz) auf die Säule geladen und mit 4 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution wurde mit 0,1 M Triethanolamin pH 11 vorgenommen und die eluierten Fraktionen sofort mit 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl pH 7,5 neutralisiert.

Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, pH 7

Elutionspuffer: 0,1 M Triethanolamin pH 11

3.3.6.3 HPLC-Aufreinigung der Toxin B Spaltprodukte

Zur Herstellung von Spaltprodukten wurden 400 µg Toxin B gelöst in 10 mM Tris-HCl pH 8,5 mit 50 µM Inositolhexaphosphat in einem Gesamtvolumen von 20 ml für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung dieses Reaktionsgemisches mittels HPLC. Verwendet wurde ein Mono Q-Anionenaustauscher (GE-Healthcare, Freiburg). Die gebundenen Spaltprodukte von Toxin B wurden mit einem Gradienten 20-80 % Puffer B in 48 Säulenvolumen bei 1 ml/min eluiert.

Puffer A: 10 mM Tris-HCl; pH 8.5

Puffer B: 10 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; pH 8.5

3.3.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Milzelleextrakt oder HPLC-Fractionen wurden 1:1 mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt und auf dem Vortexer gemischt. Anschließend folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge 5415, Eppendorf). Die wässrige obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol-Chloroform versetzt. Dieser Vorgang wurde 4 mal wiederholt. Im letzten Extraktionsschritt wurde 100 % Chloroform verwendet um Phenolreste zu entfernen. Mit der wässrigen Phase wurde weiter experimentiert.

3.3.8 Enzymatische Versuche

3.3.8.1 Proteinase K

Es wurden 300 µl einer aus Milzelleextrakt aufgereinigten Fraktion mit Proteinase K (Endkonzentration 1mg/ml, Fermentas, St. Leon Rot) versetzt, für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 5-mal mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteinase K wieder aus dem

Reaktionsgemisch zu entfernen. Bei der Extraktion wurde immer die obere wässrige Phase weitergeführt und letztlich in die Spaltungsassays eingesetzt.

3.3.8.2 RNase I und DNase I

Aus Milzzelleextrakt aufgereinigte Fraktionen (8 μ l) wurden mit zwei Units RNase I (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt, für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im Spaltungsassay eingesetzt. Da RNase I keine bivalenten Ionen benötigt und im gleichen Puffer aktiv ist, in dem auch der Spaltungsassay durchgeführt wird, war danach keine Umpufferung erforderlich.

5 Units DNase I (Fermentas, St. Leon Rot) wurden mit 8 μ l aufgereinigter Fraktionen aus Milzzelleextrakt und 10x DNase I Reaktionspuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Um zweiwertige Ionen zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch anschließend auf 10 mM Tris-HCl pH 8,5 umgepuffert (Zeba Spin Desalt Columns, Pierce, USA) und im Spaltungsassay eingesetzt.

3.3.9 In-Gel-Verdau

Aus dem SDS-PAGE-Gel wurde nach Zink-Färbung die Proteinbande ausgeschnitten, in kleine Würfel geschnitten und in ein 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden anschließend 200 μ l SDS-Laufpuffer zugesetzt und das Reaktionsgefäß für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Der Überstand wurde nachfolgend abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 200 μ l 50 mM NH_4HCO_3 in H_2O versetzt und erneut für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet diesmal in 200 μ l 50 mM NH_4HCO_3 , 50 % Azetonitril aufgenommen. Der erneuten Behandlung im Ultraschallbad folgte die Aufnahme des Pellets in 200 μ l 100 % Azetonitril. Wieder folgte eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad und schließlich das Versetzen des Pellets mit 100 μ l 1,5 mg/ml DTT in 50 mM NH_4HCO_3 in H_2O mit einer einstündigen Inkubation bei 56 °C. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 100 μ l 10 mg/ml Iodacetamid in 50 mM NH_4HCO_3 in H_2O für 45 min im Dunkeln inkubiert und 2-mal in aufeinander folgenden Schritten mit 200 μ l 50 mM NH_4HCO_3 , 50 % Azetonitril versetzt und für 5 min mit Ultraschall behandelt. Im letzten Waschschrift wurde das Pellet

in 100 μ l 100 % Azetonitril aufgenommen und nach Ultraschallbehandlung für 1 min in der Speed Vac eingengt. Trypsin (Trypsin Gold Grade, Promega, Mannheim) wurde 1:40 in 50 mM NH_4HCO_3 verdünnt, das Pellet mit 30 μ l Trypsinlösung versetzt und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 30 μ l 50 mM NH_4HCO_3 in H_2O bei 37 °C über Nacht quellen gelassen. Anschließend wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde zwei Waschschrritten in 50 μ l 50 % Azetonitril und 1 % Formaldehyd unterzogen, für 15 min Ultraschallbad belassen, das Pellet vom Überstand durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand separiert. Im letzten Schritt wurden 50 μ l 100 % Azetonitril zur Aufnahme des Pellets verwendet. Die gesammelten Überstände wurden schließlich für 30 min bei -80 °C eingefroren und abschließend in der Speed Vac bis auf ca. 20 μ l eingengt. Die Lagerung der so gewonnenen Substanzen erfolgte bei -20 °C.

3.3.10 Massenspektrometrische Analysen

3.3.10.1 Analysen von HPLC-Fraktionen

Lyophilisierte Fraktionen wurden in 50 % Azetonitril/Wasser (LC-MS Grade, Merck, Darmstadt) aufgenommen. Davon wurden 1-2 μ l auf goldbeschichtete Glaskapillaren (TypeC nanoflow needle, Waters) geladen und in die Nano-ESI-Quelle mit einer Ladung von 500-800 V eingeführt, so dass ein Elektrospray von 50 nl min^{-1} entstand.

Verwendet wurde ein QTOF-Massenspektrometer (Waters, USA) mit „electrospray ionization“-Einheit (ESI). Die Analysen wurden im Negativ-Ionen-Modus durchgeführt. Es wurde eine Auflösung von 10.000 für einfach geladene Ionen gewählt und im V-Modus operiert. Prominente Peaks wurden manuell ausgewählt und im MS/MS-Modus fragmentiert. Hierfür wurde eine Kollisionsenergie von 15-30 eV genutzt.

3.3.10.2 Analyse von EPNP-modifiziertem und unmodifiziertem Toxin B

2 µg von unmodifiziertem bzw. EPNP-modifiziertem Toxin B wurden durch einen In-Gel-Verdau mit Trypsin (Promega, Mannheim) verdaut. Die 2 µl der tryptischen Peptide wurden über eine Kapillar-Flüssigkeits-Chromatographie mit einer Reverse-Phase-Säule (Waters NanoEase BEH C₁₈, 75 µm x 10 cm) aufgetrennt und über einen Gradienten von 3-40 % Puffer B über 90 min bei 300 nl/min eluiert. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit einem QTOF-Massenspektrometer durchgeführt. Die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde mit einer [Glu-1]-Fibrinopeptid-Lösung (500 fmol/µl) bei 300 nl/min erreicht. Die Auswertung der Rohdaten und die Annotierung der Fragment-Ionen-Serien erfolgte mit der MassLynx4.1-Software (Waters, USA).

Puffer A: 0,1 % Ameisensäure in H₂O

Puffer B: 0,1 % Ameisensäure in Azetonitril

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Publikation von Rupnik et al. (2005), in der nachgewiesen werden konnte, dass zelluläre Faktoren an der Spaltung und damit verbunden der Aktivierung des TcdB beteiligt sind. Basis für die Experimente war die Fluoreszenz-Markierung des TcdB mit Cy3. Das so markierte Toxin B wurde unter Einsatz von Zellextrakten kontrolliert gespalten. Die Fragmente hatten eine Größe von 210 und 63 kDa. Durch Ansequenzierung gelang es Rupnik und Kollegen (2005), die Spaltstelle zwischen den beiden Aminosäuren 543 und 544 zu identifizieren. Da TcdB-Cy3 ohne Zusatz von zellulären Faktoren auch auf lange Sicht stabil blieb, wurde gefolgert, dass das spaltende Prinzip eine zelluläre Protease sein müsse. Unterstützt wurde diese Schlussfolgerung durch den Einsatz von Proteasehemmstoffen. Von den verwendeten Inhibitoren (α -Makroglobulin, EDTA, Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A) war allein der Aspartatproteasen-Inhibitor Pepstatin A wirksam und vermochte die Spaltung vollständig zu unterbinden.

4.1 Kopplung von TcdB mit dem Cy3 Fluoreszenzfarbstoff

Basis für die Identifikation der TcdB-spaltenden Protease in der vorliegenden Arbeit war der von Rupnik et al. (2005) aufgezeigte Weg, die Spaltung des Toxins unter Verwendung von Cy3-gekoppeltem TcdB sichtbar zu machen.

In den geplanten Arbeiten sollte, wie durch Rupnik et al. (2005) beschrieben, die Modifikation von TcdB durch einen Cy3-NHS-Ester eingesetzt werden, um Spaltreaktionen sichtbar zu machen. Die Reaktion dieses Fluorophors erfolgt über die ϵ -Aminogruppe von Lysin. Zur Optimierung des Kopplungsprozesses wurde die Umpufferung des TcdB über Zeba Desalt Spin Säule statt Dialyse durchgeführt. Außerdem stellte sich ein molares Verhältnis des Cy3-markierten Toxins von 1:1 (TcdB: Cy3) als optimal für die Spaltung heraus. Das nachfolgende Protokoll führte zu einer optimalen Spaltung von TcdB des Stammes VPI10463 mit sonifiziertem CHO-Zellextrakt:

Protokoll zur Kopplung von Cy3 an TcdB

1. Umpuffern von 100 µg TcdB auf 0,1 M NaHCO₃ pH 8,5 mit Hilfe der Zeba Desalt Spin Column
2. Hinzufügen von 2,2 µl Cy3-NHS-Ester (0,1 mg/ml)
3. Reaktion bei 22°C für 1h auf dem Orbitalschüttler
4. Umpuffern auf 10 mM Tris pH 8 mit Hilfe der Zeba Desalt Spin Column
5. Aufbewahrung bei -80 °C

In den nachfolgenden Experimenten wurde immer TcdB des Stammes VPI 10463 verwendet, es sei denn, andere Toxine werden speziell angesprochen. Abbildung 8 zeigt exemplarisch ein Ergebnis der Spaltung des TcdB-Cy3s nach Zugabe von CHO-Zellextrakt. Die Spaltprodukte sind entsprechend der Schemazeichnungen von Abb. 2 links neben dem SDS-PAGE aufgeführt. Zu sehen sind das TcdB Holotoxin (270 kDa), das Fragment bestehend aus der Liganden- und Transmembrandomäne (207 kDa) und das Fragment mit der katalytischen Domäne (63 kDa).

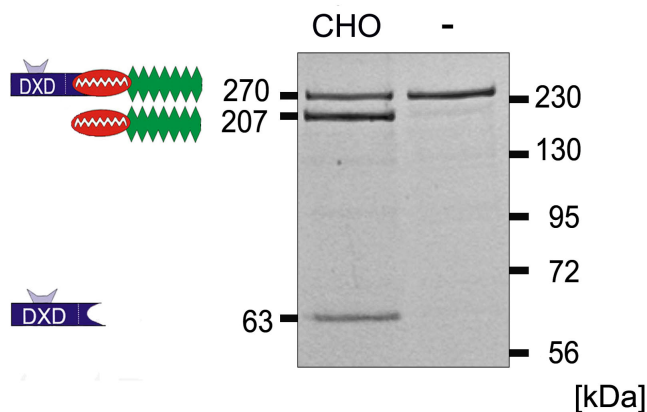


Abbildung 8: Einsatz von CHO-Zellextrakten zur Spaltung von Cy3-markiertem TcdB

Zur Spaltung von Cy3-markiertem TcdB wurde CHO-Zellextrakt eingesetzt, der durch Ultraschallaufschluss der Zellen gewonnen wurde. CHO: Reaktion unter Gegenwart von CHO-Zellextrakt; (-): die gleiche Reaktion ohne Zellextrakt. Die Spaltprodukte wurden im SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt, Visualisierung mit dem Fluoreszenz-imager.

4.2 Testung von Zellextrakten

Um die nach Rupnik et al. (2005) postulierte zelluläre Protease isolieren zu können, war die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Zellmaterial für die Aufreinigungen in

der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) erforderlich. Im humanen Organismus sind die Enterozyten des Kolons die Zielzellen der *C. difficile* Toxine. Es bot sich deshalb an, Enterozyten eines Organismus, der ebenfalls an *C. difficile* Infektionen erkrankt, für die Aufreinigungen zu verwenden. Ein solcher Organismus ist das Schwein (Songer & Anderson 2006). Im lokalen Schlachthaus gab es die Möglichkeit regelmäßig Schweinedärme zu erhalten, die daraus gewonnenen zytosolischen Enterozytenextrakte zeigten hohe Spaltungsaktivität gegenüber TcdB.

Während dieser ersten Aufreinigungen stellte sich dann jedoch heraus, dass die Enterozytenextrakte sehr viele Fette enthielten, die durch die Gewinnung der Enterozyten aus dem Schweinedarm unweigerlich in die Extrakte gelangten. Diese Fette stellten sich als große Hürde für die geplante Aufreinigung über HPLC-Säulen heraus, die Fette verstopften regelmäßig die Säulen. Ferner zeigte sich, dass die Enterozytenextrakte durch die in ihnen enthaltenen hohen Mengen an Enzymen, unter anderem Proteasen, nicht stabil genug waren, sondern innerhalb eines kurzen Zeitraums und trotz Zugabe von Protease-Inhibitoren ihre Spaltungsaktivität verloren. Vergleichbare Schwierigkeiten traten bei Verwendung von Zellextrakten aus *in vitro* kultivierten Zellen nicht auf. Bei den eingesetzten Zellen handelte es sich um T2-Zellen (humane Lymphoblasten), die im CO₂-Brutschrank mit vertretbarem Aufwand in ausreichender Menge angezogen werden konnten. T2-Zellen wachsen in Suspension und lassen sich demzufolge in Rollerflaschen kultivieren. Aus T2-Zellen generierte zytosolische Extrakte zeigten hohe Spaltungsaktivität gegenüber TcdB (nicht gezeigte Ergebnisse).

Mit T2-Zellextrakten wurden erste erfolgreiche HPLC-Aufreinigungen durchgeführt und im TcdB-Cy3-Spaltungsassay reaktive Subfraktionen identifiziert. Es zeigte sich dann aber, dass der Arbeitsaufwand und die damit verbundenen Kosten in keiner Relation zur quantitativen Ausbeute an aufgereinigtem Material standen. Infolgedessen wurde die Idee tierische Organe zu verwenden, erneut aufgegriffen. Da T2-Zellen Lymphozyten sind und die Milz zum Großteil aus Lymphozyten besteht, wurden nachfolgend Milzen vom Schwein genutzt, um die notwendigen zytosolischen Extrakte herzustellen. Es zeigte sich schnell, dass derartig hergestellte Zellextrakte sehr gute TcdB-spaltende Aktivität aufwiesen und sich hervorragend für die HPLC-Aufreinigungen eigneten. Im Folgenden sind Versuche, die entweder mit aufgereinigten Milzzell- oder T2-Zellextrakten durchgeführt wurden, exemplarisch dargestellt.

4.3 HPLC-Aufreinigungen zur Isolierung der TcdB-spaltenden Protease

Zur Aufreinigung des TcdB-spaltenden Faktors wurde ein mehrstufiger Reinigungsprozess ausgearbeitet, der im Folgenden beschrieben wird. Alle Reinigungen gingen von Zellysaten aus, die entweder aus T2-Zellen oder aus Milzzellaufarbeitungen von Milzen des Schweins hergestellt worden waren. Der Verbleib der spaltenden Aktivität in den Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde im Spaltungsassay mit fluoreszenzmarkierten TcdB verfolgt. Ziel war es, den spaltenden Faktor möglichst rein vorliegen zu haben, um daran anschließend massenspektrometrische Analysen durchführen zu können.

Im Folgenden werden die Aufreinigungsschritte zusammengefasst, mit denen die spaltende Aktivität erfolgreich aufgereinigt werden konnte.

Im ersten Schritt (I) wurden 100 ml des zytosolischen Milzzellextrakts auf eine mit 10 mM Tris, pH 8,5 equilibrierte HiPrep DEAE FF-Säule, d.h. einen schwachen Anionenaustauscher, geladen. Die an die Säule gebundenen Moleküle wurden mit einem linear steigenden Salzgradienten (3-25 % B, 9 Säulenvolumen) eluiert. Fraktionen wurden einzeln gesammelt und im TcdB-Spaltungsassay auf spaltende Aktivität getestet. Fraktionen, die zu einer Spaltung von TcdB führten, eluierten bei einer Leitfähigkeit von 10,3-15,7 %. Das Elutionsprofil (Abb. 10) zeigt das Absorptionssignal der eluierten Substanzen bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge liegt eine für Proteine charakteristische Absorption vor, die durch die π -Elektronensysteme aromatischer Aminosäuren hervorgerufen wird. Die Höhe der gemessenen Absorption kann als Maß für die der Proteinmenge herangezogen werden.

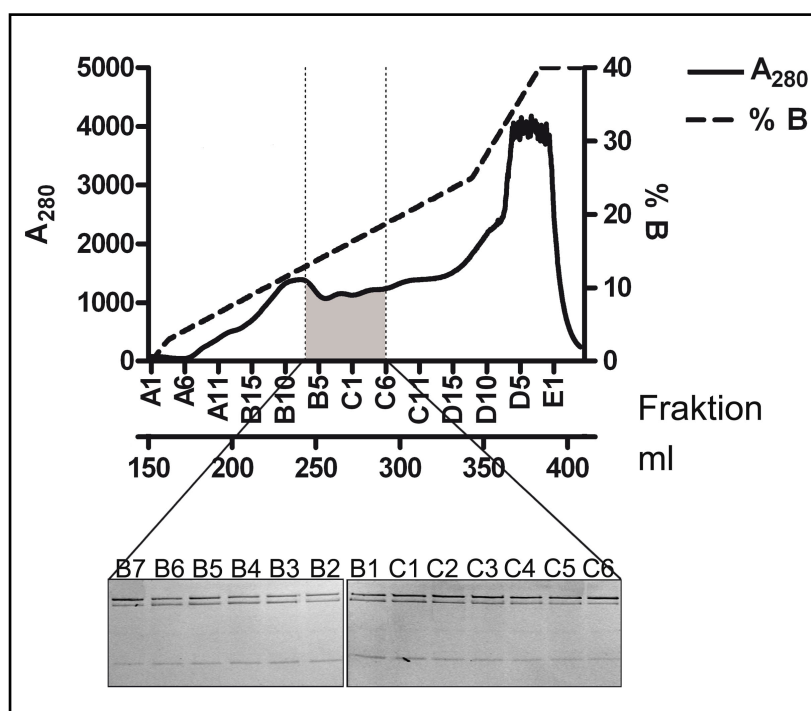


Abbildung 9: Reinigungsstufe 1: Aufreinigung von Milzextrakt über DEAE-Säule

Gezeigt wird das Elutionsprofil von Milzextrakten nach Anreinigung auf einer DEAE-Säule. Die Abszisse zur Rechten gibt den Anteil in % des Puffers B am Elutionspuffer an (Buffergradient s. gestrichelte Linie); die durchgehende Linie stellt das Chromatogramm der eluierenden Substanzen gemessen als Extinktion bei 280 nm (Abszisse zur Linken) dar; die im TcdB-Spaltungsassay (Fluoreszenzaufnahmen des SDS-Gels) aktiven Fraktionen (im Diagramm grau unterlegt) wurden zur weiteren Aufreinigung gepoolt.

Für den Reinigungsschritt II wurden die aktiven Fraktionen B7-C6 aus Schritt I vereinigt, zur Senkung des Salzgehalts um den Faktor 3 verdünnt und anschließend auf eine ResourceQ-Anionenaustauschsäule geladen. Nach der Elution ungebundenen Materials wurden die gebundenen Moleküle in zwei Stufen eluiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass aktive Fraktionen erst nach 19 % des Puffers B eluierten, so dass initial ein linearer Salzgradient von 0-19 % B eingesetzt wurde. Dadurch wurde eine effiziente Abreinigung von nicht aktiven Proteinen erreicht.

Der zweite lineare Salzgradient (zwischen 19-35 % Puffer B) bestand aus zwei Säulenvolumina und wurde steil gewählt, um die spaltende Aktivität konzentriert in geringem Volumen eluieren zu können. Gesammelte Fraktionen wurden im TcdB-Spaltungsassay auf ihre Aktivität getestet. Hierbei zeigten sich die in Abb.10 grau unterlegten Fraktionen B6-B2 als aktiv, sie eluierten bei einer Leitfähigkeit von 19-29%.

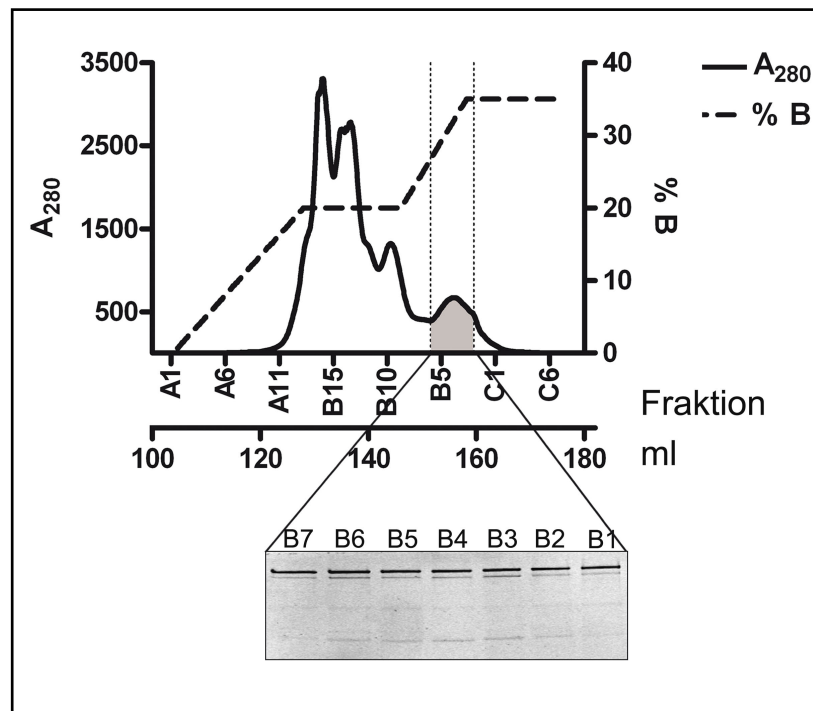


Abbildung 10: Reinigungsstufe II: Trennung der aktiven Fraktionen B7-C6 aus Schritt I durch ResourceQ Anionenaustausch

Die Fraktionen B7-C6 aus Reinigungsschritt I (Abb.10) wurden vereinigt und durch ResourceQ-Anionenaustausch weiter angereinigt. Die weiteren Erläuterungen sind der Legende der Abbildung Abb. 10 zu entnehmen.

Für den Reinigungsschritt III wurden die Fraktionen B1-B7 aus Schritt II vereinigt, lyophilisiert, in 3 ml H_2O_{dest} resuspendiert und anschließend auf eine Sephacryl S100 Gelfiltrationssäule geladen. Im TcdB-Spaltungsassay zeigten die Fraktionen B5-C1 spaltende Aktivität, sie eluierten zwischen 194 und 218,1 ml. Unter Verwendung der Referenzsubstanzen Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), RNase A (13,7 kDa) und Insulin (5,8 kDa) ließ sich der Bereich, in dem die aktiven Fraktionen eluierten, auf eine Molekülgröße von ca. 3-8 kDa eingrenzen. Dabei fiel auf, dass die Fraktionen B5-C1 keine nennenswerte Absorption bei 280 nm aufwiesen (s. Abb. 11). Unter der Annahme, es handele sich unter Umständen um eine zu geringe Menge an Protein, wurden die drei beschriebenen Aufreinigungsschritte erneut mit 100 ml Milzzellextrakt durchgeführt und die bis dahin gewonnenen aktiven Fraktionen der beiden Aufreinigungsansätze vereint.

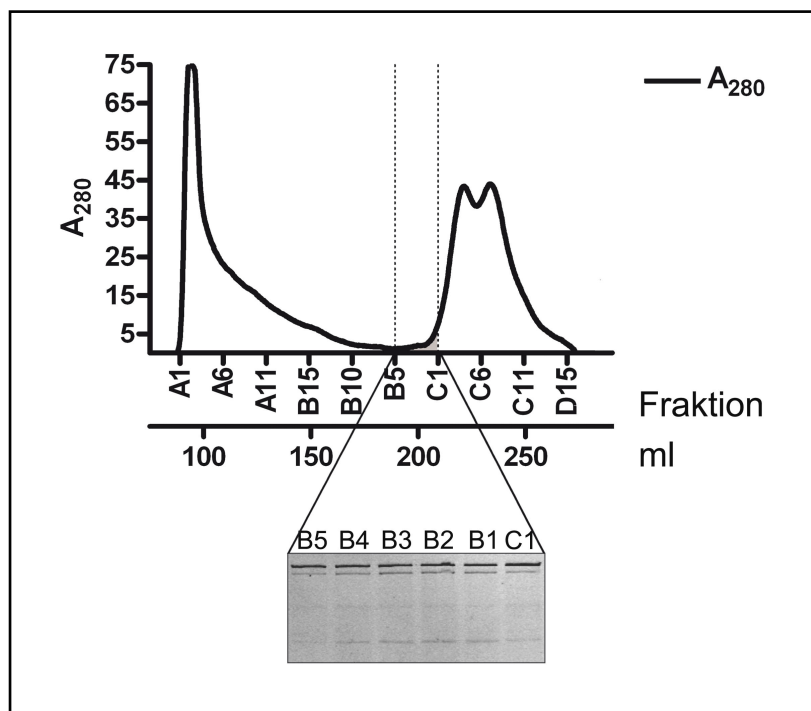


Abbildung 11: Reinigungsstufe III: Trennung der aktiven Fraktionen B1-B7 aus Schritt II durch Sephacryl S100 Chromatographie

Die gepoolten und ankonzentrierten Fraktionen B1-B7 aus Reinigungsschritt II (Abb. 10) wurden auf eine Sephacryl S100-Säule geladen; die durchgehende Linie stellt das Chromatogramm der eluierten Substanzen gemessen als Extinktion bei 280 nm (Abszisse zur Linken) dar; die im TcdB-Spaltungsassay (Fluoreszenzaufnahmen des SDS-Gels) aktiven Fraktionen (im Diagramm grau unterlegt) wurden zur weiteren Aufreinigung gepoolt.

Als vierter Schritt (IV) der Aufreinigung wurde erneut ein Anionenaustausch gewählt, da sich diese Form der Aufreinigung bereits zuvor als sehr effektiv erwiesen hatte. Diesmal wurde jedoch mit der MonoQ-Säule ein starker Anionenaustauscher ausgewählt. Eluiert wurde mit einem steigenden linearen Salzgradient (20-35 %B). Um eine hohe Trennleistung zu gewährleisten, wurde der Salzgradienten bewusst sehr flach gestaltet (36 Säulenvolumen). Die Testung der Fraktionen im TcdB-Spaltungsassay zeigte ein unerwartetes Ergebnis. Drei voneinander getrennte Bereiche wiesen spaltende Aktivität auf. Es handelte sich dabei um die Fraktionen B7-B4 (Leitfähigkeit 23,1-24 %), C3-C5 (Leitfähigkeit 25-25,7 %) und C7-C11 (Leitfähigkeit 25,9-26,7 %) in Abb.12.

Im weiteren Trennprozess wurden die entsprechenden Fraktionen voneinander getrennt aufgereinigt. Beispielfhaft wird im Folgenden nur die Aufreinigung der Fraktionen C7-C11 beschrieben. Die Aufreinigungen der beiden anderen gepoolten Bereiche lieferten entsprechende Resultate.

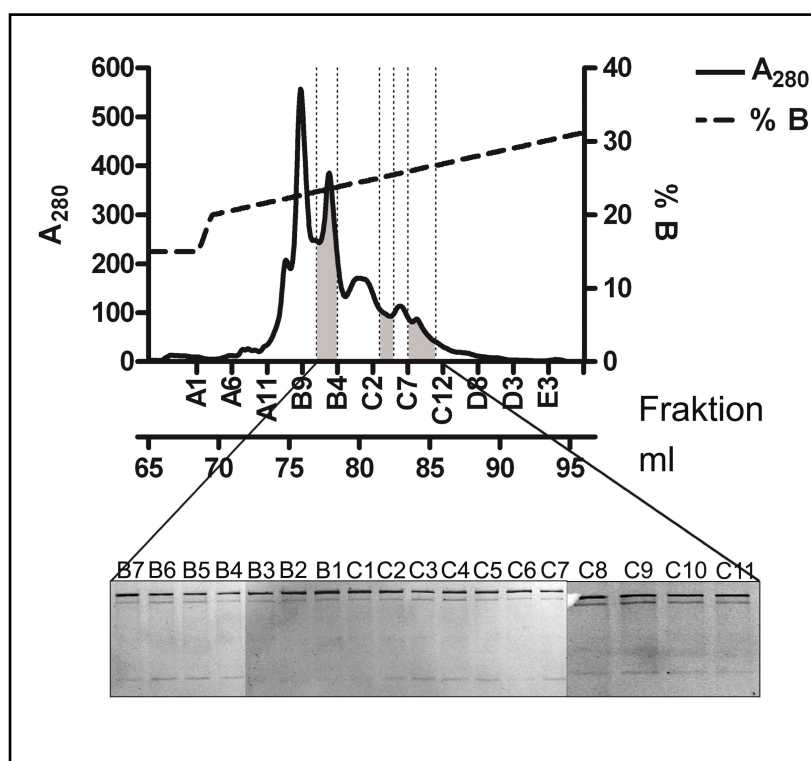


Abbildung 12: Reinigungsstufe IV: Anreicherung der gepoolten Fraktionen B5-C1 aus Schritt III durch MonoQ-Anionenaustausch

Die gepoolten Fraktionen B5-C1 aus Reinigungsschritt III wurden durch MonoQ-Anionenaustausch weiter aufgereinigt. Die weiteren Erläuterungen sind der Legende der Abbildung Abb. 12 zu entnehmen.

Für den Reinigungsschritt V wurden die Fraktionen IV.C7-C11 aus Schritt IV vereint, um den Faktor 3 verdünnt und erneut auf einen MonoQ-Anionenaustauscher geladen. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Substanzen wurden die gebundenen Moleküle mit einem linear steigenden Salzgradienten (2-35% B, 30 Säulenvolumen) eluiert. Im TcdB-Spaltungsassay wurden wiederum alle Fraktionen getestet. Nur die Fraktionen V.C3-C6 erwiesen sich als aktiv, sie eluierten bei einer Leitfähigkeit von 23,4-24,2 %. Dieser MonoQ-Anionenaustausch wurde auch mit den beiden anderen aktiven Bereichen der vorhergehenden Reinigungsstufe IV durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Die Aufreinigung der Fraktionen IV.B7-B4 führte zu den aktiven Fraktionen V.B4-B2 (Leitfähigkeit 22,2-22,8 %), die der Fraktionen IV.C3-C5 zu den aktiven Fraktionen V.F12-F10 (Leitfähigkeit 22,7-23,5 %).

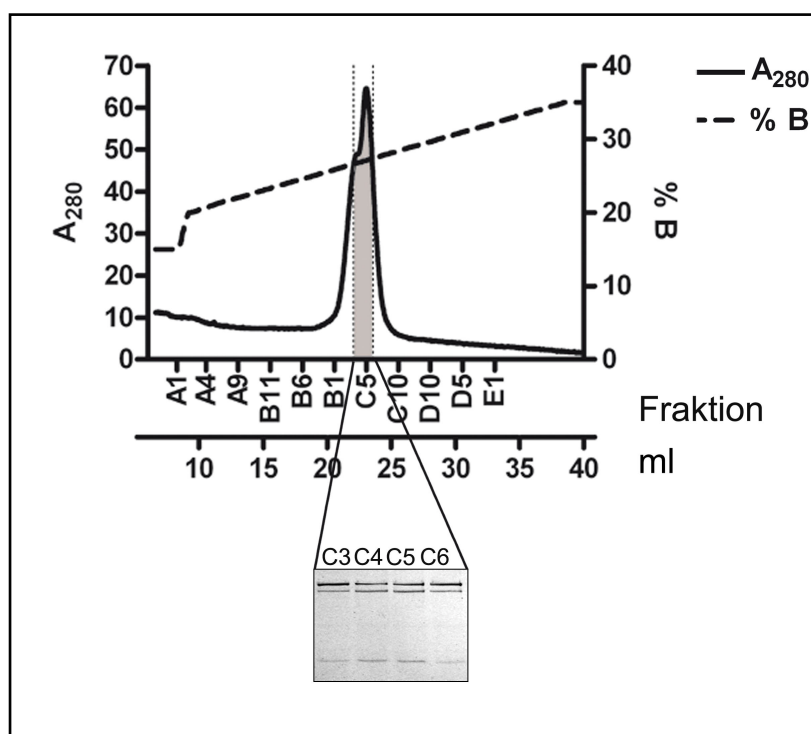


Abbildung 13: Reinigungsstufe V: Anreicherung der gepoolten Fraktionen IV.C7-C11 durch erneuten MonoQ-Anionenaustausch

Die Fraktionen IV.C7-C11 aus dem ersten MonoQ-Anionenaustausch (Schritt IV) wurden in einem zweiten MonoQ-Anionenaustausch weiter aufgereinigt. Weitere Erläuterungen sind der Legende der Abbildung 13 zu entnehmen.

Die aktiven Fraktionen V.C3-C6 und des Aufreinigungsschrittes V wurden jeweils separat zusammengeführt, lyophilisiert und in 250 μ l H₂O (HPLC Qualität) aufgenommen. In gleicher Weise wurden die aktiven Fraktionen V.B4-B2 und V.F12-F10 prozessiert, die aus den aktiven Fraktionen IV.B7-B4 und IV.C3-C5 resultierten (Chromatogramme nicht aufgeführt). Für den abschließenden sechsten Schritt (VI) der Aufreinigung wurde eine Superdex S75-Gelfiltrationssäule ausgewählt. Dadurch wurde erreicht, dass die gereinigten aktiven Fraktionen kein Salz enthalten, wie dies nach Anionenaustausch der Fall gewesen wäre. Um sicherzustellen, dass die Fraktionen für nachfolgende Experimente in „salzlosem Puffer“ vorliegen, wurde die S75-Gelfiltration in Gegenwart von 100 mM Ammoniumacetat pH 7,5 ausgeführt. Beide Bestandteile dieses Puffers lassen sich rückstandslos lyophilisieren. Auf diese Weise konnten die Fraktionen ohne weitere Schritte in dem für die nachfolgenden Experimente passenden Puffer aufgenommen werden. Aus den eingesetzten Fraktionen V.B4-B2 wurden die Fraktionen VI.C5-C8 (14,5-16,5 ml) als aktiv im Spaltungsassay getestet. Die Fraktionen V.C3-C6 führten zu den aktiven Fraktionen VI.C3-C6 (14,3-16,3 ml) und die Fraktionen V.F12-F10 ergaben die aktiven Fraktionen VI.C6-C9 (15,7-17,7 ml). Die Fraktionen wurden separat lyophilisiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

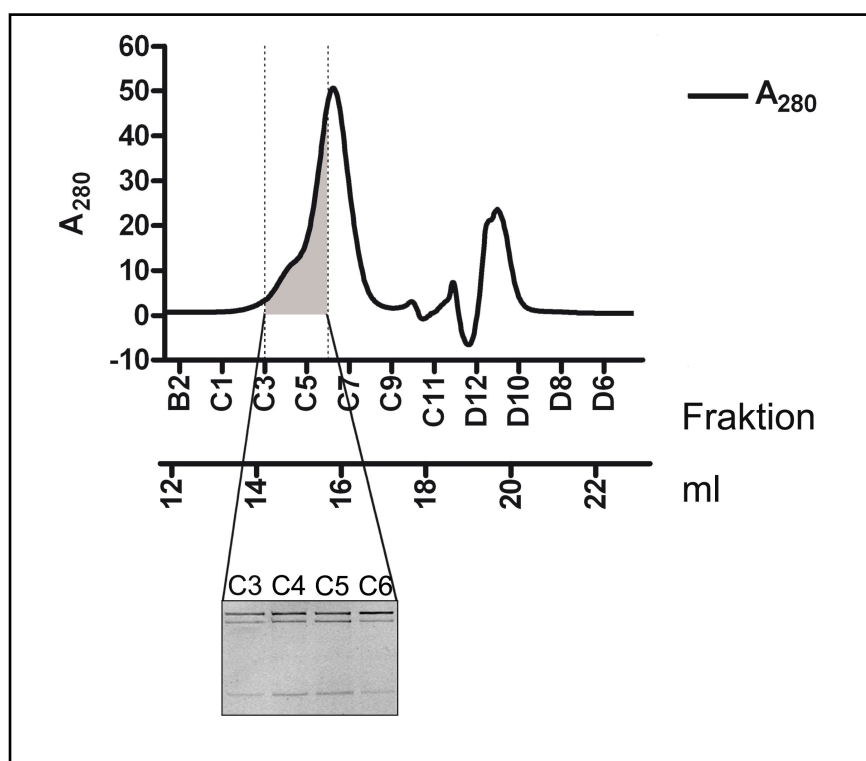


Abbildung 14: Reinigungsstufe VI: Abschließende Reinigung der Fraktionen C3-C6 aus Schritt V durch Superdex S75-Chromatographie

Die gepoolten und ankonzentrierten Fraktionen V.C3-C6 aus Reinigungsschritt V (Abb. 13) wurden auf eine Superdex S75-Gelfiltrationssäule geladen; die durchgehende Linie stellt das Chromatogramm der eluierenden Substanzen gemessen als Extinktion bei 280 nm (Abszisse zur Linken) dar; die im TcdB-Spaltungsassay (Fluoreszenzaufnahmen des SDS-Gels) aktiven Fraktionen (im Diagramm grau unterlegt) wurden separat lyophilisiert.

Auch auf der Superdex S75-Säule wurde ermittelt, in welchem Größenbereich die aktiven Fraktionen eluieren. Anhand der Eichung, die mit den oben bereits genannten Referenzsubstanzen ausgeführt wurde, wurde für die TcdB-spaltende Substanz/Substanzen erneut eine Größe zwischen 1 und 5 kDa bestimmt.

4.4 Eingrenzung der Substanzklasse der TcdB-spaltenden zytosolischen Faktoren

Im Verlauf der Aufreinigungsversuche traten einige Unstimmigkeiten mit der Hypothese zu Tage, dass Toxin B durch eine Wirtszell-Protease gespalten wird. Frühe Beobachtungen waren das Ausbleiben der Ankonzentrierung der Aktivität durch Ammoniumsulfatfällung, die Beobachtung, dass einige Säulenmaterialien nicht zur Aufreinigung verwendet werden konnten; und schließlich, dass die Eingrenzung der Größe der gesuchten Substanz 1 bis 5 kDa ergab. An diesem Punkt der Experimente zur

vorliegenden Arbeit wurden Versuche konzipiert, die Aufklärung bringen sollten, ob es sich bei der gesuchten aktiven Substanz tatsächlich um ein Protein handelt oder nicht doch um Moleküle einer anderen Substanzklasse.

4.4.1 Suche nach Proteinen im Deep Purple-gefärbten SDS-PAGE

Unter der Annahme, es handele sich bei der gesuchten zytosolisch-spaltenden Aktivität um ein Protein, wurden Versuche unternommen, die aufgereinigten, hoch aktiven Fraktionen in SDS-PAGE-Banden darzustellen. Dazu wurden die aufgereinigten aktiven Fraktionen VI.C4 und VI.C5 der finalen Gelfiltration in 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und in einem denaturierenden Tris-Tricine-Gradientengel (10-20 %) aufgetrennt, um etwaige Proteine anschließend mit Deep Purple Total Protein Stain zu färben. Die Deep Purple-Färbung ermöglicht eine Detektion von bis zu 0,5 ng Protein und ist damit empfindlicher als Silber- und Coomassie-Färbung.

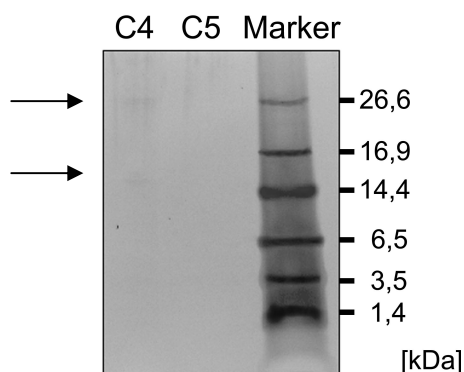


Abbildung 15: Versuch des Nachweises geringer Proteinmengen im SDS-PAGE nach Deep Purple-Färbung

Die Fraktionen VI.C4 und VI.C5 aus dem Aufreinigungsgang der Milzzellen des Schweins wurden in einem Tris-Tricine-Gradientengel (10-20 %) aufgetrennt und mit Deep Purple Total Protein Stain gefärbt. Das Bild zeigt eine Aufnahme im Fluoreszenzimager.

Trotz der hoch sensitiven Deep Purple-Färbung konnten lediglich zwei schwache Banden (ca. 14,4 und 26,6 kDa) in Fraktion VI.C4 detektiert werden, die nicht in dem durch Gelfiltration (III, VI) abgeschätzten Größenbereich lagen. Fraktion VI.C5 zeigte sogar keinerlei Banden. Beide Fraktionen besaßen jedoch deutliche Aktivität im TcdB-Spaltungsassay. Auch dieses Experiment lässt die Hypothese von Rupnik et al. (2005) in Zweifel ziehen, dass der zelluläre Faktor eine Protease ist.

4.4.2 Physiko-chemische Untersuchungen

Weitere Aufklärung zu welcher Substanzklasse der aktive Faktor gehört, sollten klassisch physiko-chemische Untersuchungen erbringen.

Als erstes wurde Milzzelleextrakt für 30 min auf 96 °C erhitzt, abzentrifugiert und der Überstand im Spaltungsassay getestet. Proteine reagieren auf thermische Belastung mit dem Verlust der Struktur (Denaturierung), sie fallen aus und befinden sich danach nicht mehr im Überstand.

Eine weitere Methode um Proteine effizient aus einer Lösung zu entfernen, ist die Phenol-Chloroform-Extraktion. Milzzelleextrakte wurden mehrfach mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch extrahiert und die wässrige Phase im TcdB-Spaltungsassay untersucht.

Um den Erhalt der spaltenden Aktivität in zytosolischen Extrakten von Milzzellen nach Erhitzung bzw. nach Phenol-Chloroform-Extraktion vergleichend zu untersuchen, wurden mehrere Verdünnungsstufen (1:30, 1:100, 1:300) im Vergleich zu unbehandeltem Milzzelleextrakt getestet (Abb. 17).

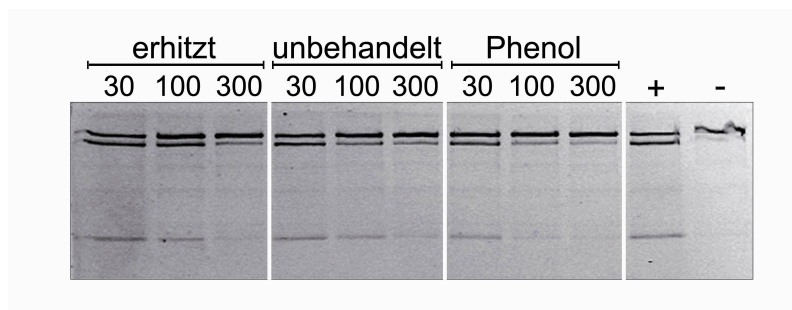


Abbildung 16: Vergleichende TcdB-Spaltungsassays mit unbehandelten, erhitzten bzw. Phenol-Chloroform-extrahierten Milzzelleextrakten

Milzzelleextrakt wurde erhitzt, mit Phenol-Chloroform extrahiert oder unbehandelt in Verdünnungen von 1:30 (30), 1:100 (100) und 1:300 (300) in den Spaltungsassay mit Cy3-markiertem TcdB eingesetzt. Zur Positiv-Kontrolle diente unverdünnter, unbehandelter Milzzelleextrakt (+); als Negativkontrolle ein Spaltungsassay ohne Zelleextrakt (-). Das Bild zeigt eine Aufnahme im Fluoreszenzimager.

Abbildung 16 zeigt, dass erhitzte Extrakte und unbehandelte Extrakte vergleichbare spaltende Aktivität besitzen. Die Denaturierung von Proteinen nach Erhitzen hätte demgegenüber den Verlust der spaltenden Aktivität zur Folge haben müssen. Die mit Phenol-Chloroform behandelten Milzzelleextrakte verloren nur geringfügig an Aktivität, zu erkennen vor allem an der 1:100 (100)-Verdünnung. Solch geringfügige Verluste an Spaltaktivität können zum einen auf Volumenverluste im Rahmen der fünfmaligen Extraktion, zum anderen auf Rückstände von Chloroform zurückzuführen sein. Bei der

entsprechenden Behandlung eines Proteins, z.B. einer zellulären Protease, wäre die spaltende Aktivität vollständig verloren gegangen und hätte noch nicht einmal zu geringem Teil erhalten bleiben dürfen. Auch diese Ergebnisse sprachen demnach eindeutig gegen die Hypothese, dass die Spaltung von einer zytosolischen Protease katalysiert wird.

4.4.3 Enzymatische Untersuchungen

Zur weiteren Eingrenzung der Substanzklasse der gesuchten zytosolischen Faktoren wurden unterschiedliche Enzyme eingesetzt, die die Zielsubstanzen verdauen sollten.

Beim Einsatz von Proteinase K, einem Enzym, das Proteine bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäuren (aliphatische, aromatische und andere hydrophobe Aminosäuren) verdaut, werden Proteine bis zu Tetrapeptiden herunterverdaut. Der Proteinase K-Verdau einer zytosolischen Protease sollte demnach den kompletten Verlust der spaltenden Aktivität zur Folge haben.

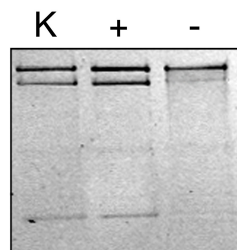


Abbildung 17: Spaltungsassay von aufgereinigtem Zellextrakt nach Proteinase K-Verdau

Aufgereinigter Zellextrakt wurde mit Proteinase K inkubiert, anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und die wässrige Phase auf spaltende Aktivität mit Cy3-markiertem Toxin getestet (K). Die Positivkontrolle (+) wurde mit der wässrigen Phase der Phenol/Chloroform Extraktion von aufgereinigtem Milzzellextrakt und die Negativkontrolle (-) ohne Zugabe von Zellextrakt durchgeführt.

Beim Einsatz von Proteinase K-verdauten aufgereinigten, aktiven Fraktionen (Herstellung s. Material & Methoden) wurde im TcdB-Spaltungsassay aber keine Auswirkung der Behandlung des Zellextraktes mit Proteinase K erkenntlich. Dieser Versuch widerlegt die Hypothese, dass ein zytosolisches Protein das Toxin spaltet.

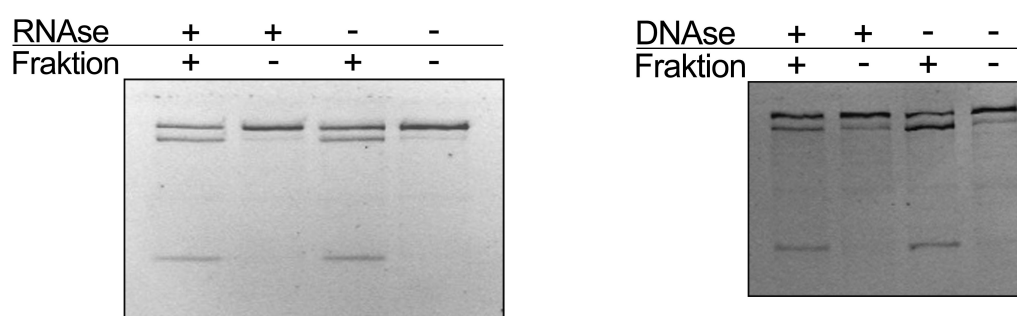
Nachdem Proteine als Auslöser der TcdB-Spaltung ausgeschlossen waren, und demgegenüber DNA und RNA die klassische Phenol/Chloroform-Extraktion schadlos überstehen und in der wässrigen Phase verbleiben, wie auch die TcdB-spaltende zytosolische Aktivität, wurden Nukleosid-di- und -tri-Phosphate in den TcdB-Spaltungsassay eingesetzt.

Tabelle 2: Nukleosid-di- und -triphosphate im TcdB-Spaltungsassay

Im TcdB-Spaltungsassay eingesetzte Nukleosid-di- und -tri-phosphate in den maximal getesteten Konzentrationen.

Substanz	Konzentration
dATP	≥ 50 mM
dGTP	≥ 1 mM
dCTP	≥ 1 mM
dTTP	≥ 1 mM
ATP	≥ 4 mM
CTP	≥ 4 mM
GTP	≥ 4 mM
UTP	≥ 4 mM
UDP	≥ 5 mM

Deshalb wurden Ribonuklease I (Rnase I) und Dexoyribonuklease I (Dnase I) auf ihre Wirkung im Spaltungsassay getestet. RNase I ist ein Enzym, das die Phosphodiesterbindung von RNA schneidet und somit die RNA in ihre Nukleotide zerlegt. DNase I verdaut DNA und setzt dabei auch an Phosphodiesterbindung an, es entstehen Mono- und Oligodeoxyribonukleotide. Würde die TcdB-Spaltung durch eine Substanz dieser Familien katalysiert, so sollte RNase- oder DNase-Verdau die TcdB-Spaltung inhibieren.

**Abbildung 18: Spaltungsassay von aufgereinigtem Zellextrakt nach RNase I-/DNase I-Verdau**

Aktive Fraktionen aus der Aufreinigung von Zellextrakt wurden mit RNase I bzw. DNase I versetzt und im TcdB-Spaltungsassay getestet; in der Kopfzeile der Abbildung zeigt ein (+) den Einsatz von Enzym oder aktiven zytosolischen Fraktionen an, ein (-), dass die jeweiligen Stoffe dem TcdB-Spaltungsassay nicht zugesetzt wurden.

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis des entsprechenden TcdB-Spaltungsassays. Sowohl RNase I als auch DNase I zeigten keinen Einfluss auf Toxin B und dessen Spaltung in die 63 und 207 kDa

großen Fragmente. Damit waren auch diese Substanzklassen als zytosolische Faktoren der TcdB-Spaltung ausgeschlossen.

4.4.4 Massenspektrometrische Untersuchungen

Um einen direkten Zugang zur Natur der zytosolischen Substanzen zu erhalten, wurden die hoch aufgereinigten Fraktionen des sechsten Aufreinigungsschrittes zur Untersuchung in der Massenspektrometrie eingesetzt.

Die in Kapitel 4.3 beschriebenen aktiven Fraktionen VI.C4-VI.C6 aus der Aufreinigung von Milzzellextrakten wurden nach unterschiedlichen Methoden im Massenspektrometer analysiert. Maldi-Toff-Massenspektrometrie, als auch Untersuchungen im positiven Modus Nano-Electrospray-Ionization Quadrupole Time-of-Flight (nanoESI-QTOF) Massenspektrometrie, brachte nur Hintergrundsignale (Ergebnisse nicht aufgeführt). Ergebnisse, die Aufschluss über die angereinigten Substanzen gaben, konnten allein im Negativ Modus der nanoESI-QTOF Massenspektrometrie erzielt werden. Abbildung 19 zeigt den ersten Schritt, bei dem von den Fraktionen C4-C6 Übersichtsspektren erzeugt wurden. Abgebildet sind die Spektren mit einem Massenbereich von 50-1500 Da.

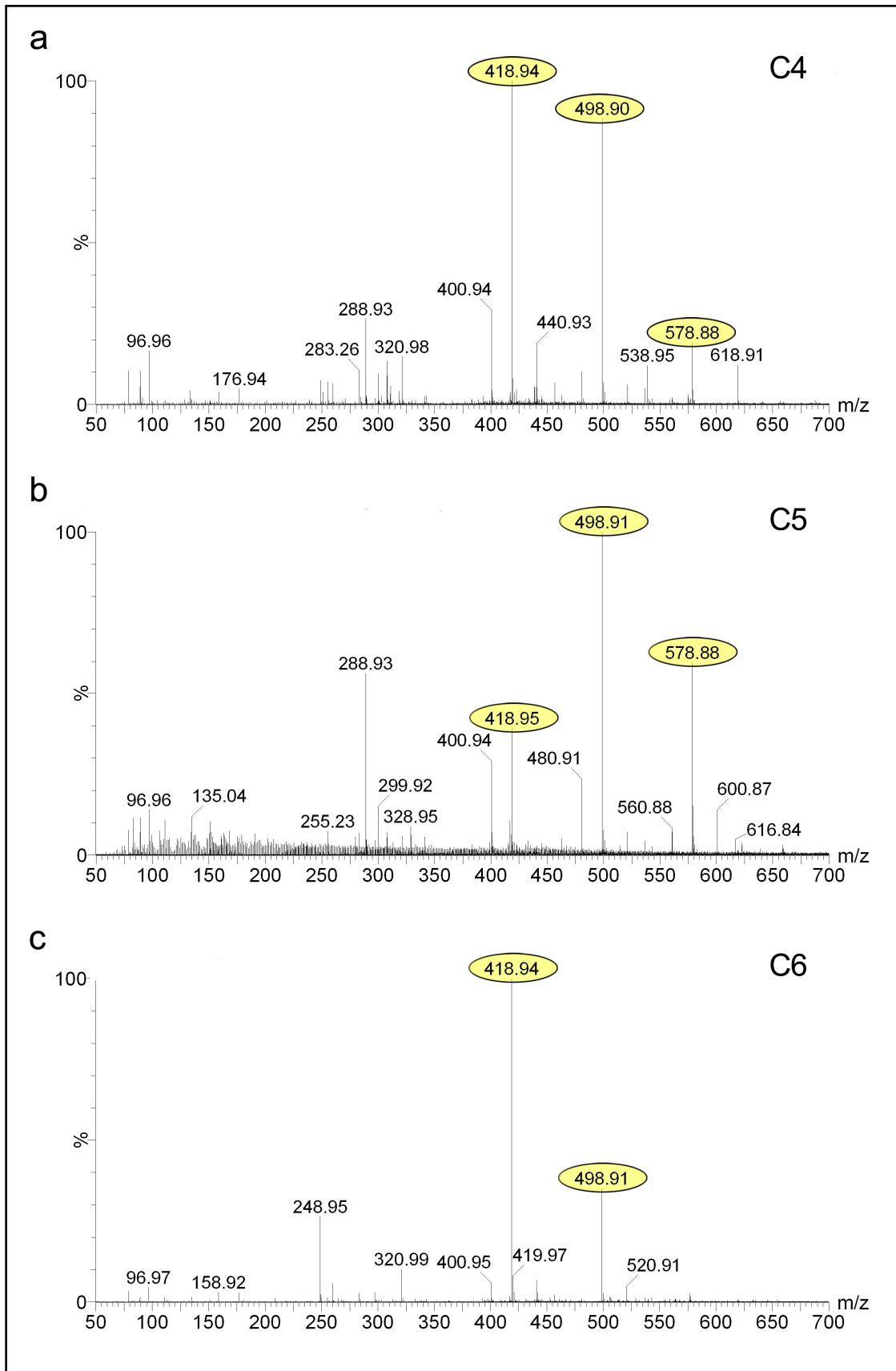


Abbildung 19: Massenspektrometrische Untersuchungen der Fraktionen VI.C4-C6 im Negativ-Modus

Die Abbildung zeigt Spektren im Massenbereich von 50-1500 Da der Fraktionen C4-C6 (a-c). Die Hauptpeaks sind eingekreist und gelb unterlegt. Aufgetragen sind die gemessenen Intensitäten (in %) der analysierten Einzelsubstanzen in Anhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z ; hier einfach geladene Moleküle). (a) Übersichtsspektrum der Fraktion C4, mit drei Hauptpeaks der Masse 418,94, 498,90 und 578,88 D; (b) Übersichtsspektrum der Fraktion C5, mit drei Hauptpeaks der Masse 418,95, 498,91 und 578,88 Da; (c) Übersichtsspektrum der Fraktion C6, mit zwei Hauptpeaks der Masse 418,94 und 498,91 Da.

Die Übersichtsspektren der Fraktionen VI.C4-C6 weisen Hauptpeaks der Massen 418,94/418,95, 498,90/498,91 und 578,88 Da auf (in Abb. 19 eingekreist und gelb unterlegt). Peaks dieser Massen sind in allen drei Fraktionen wieder zu finden, es sind jeweils die dominanten Peaks. Auffallend ist die Massendifferenz von 79,97/79,96 Da zwischen den dominanten Peaks jedes Spektrums. Vereinfachend wird im Folgenden von einer 80 Da-Differenz gesprochen. Am Beispiel des Übersichtsspektrums der Fraktion VI.C5 ist diese Massendifferenz in Abbildung 20 dargestellt.

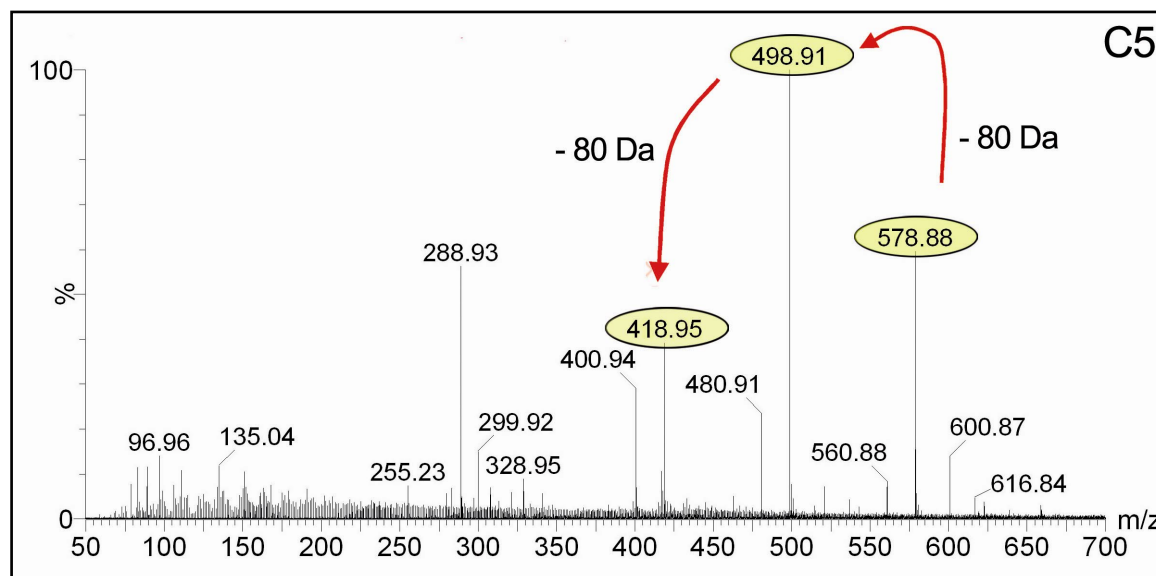


Abbildung 20: Darstellung der Massendifferenzen zwischen den Hauptpeaks in Fraktion VI.C5

Im Übersichtsspektrum der Fraktion VI.C5 unterscheiden sich die dominanten Peaks durch eine Massendifferenz von 80 Da (rote Pfeile); die formelle Darstellung entspricht der für Abb. 19 beschriebenen.

Die Massendifferenz von 80 Da ist typisch für Phosphatgruppen (HPO_3). Da die Differenz mehrfach auftritt, verdeutlichen die Übersichtsspektren, dass die in der vorliegenden Arbeit aufgereinigten Substanzen der Milzzelleextrakte mehr als eine Phosphatgruppe enthalten.

Um weitere Detailinformationen über einzelne Peaks (Moleküle) zu erhalten, wurden sie durch manuelle Auswahl einer weitergehenden Fragmentierung unterzogen. Abbildung 21 zeigt das Fragmentierungsspektrum der Substanz mit der Masse 578,88 Da, nach Kollision mit Argonatomen.

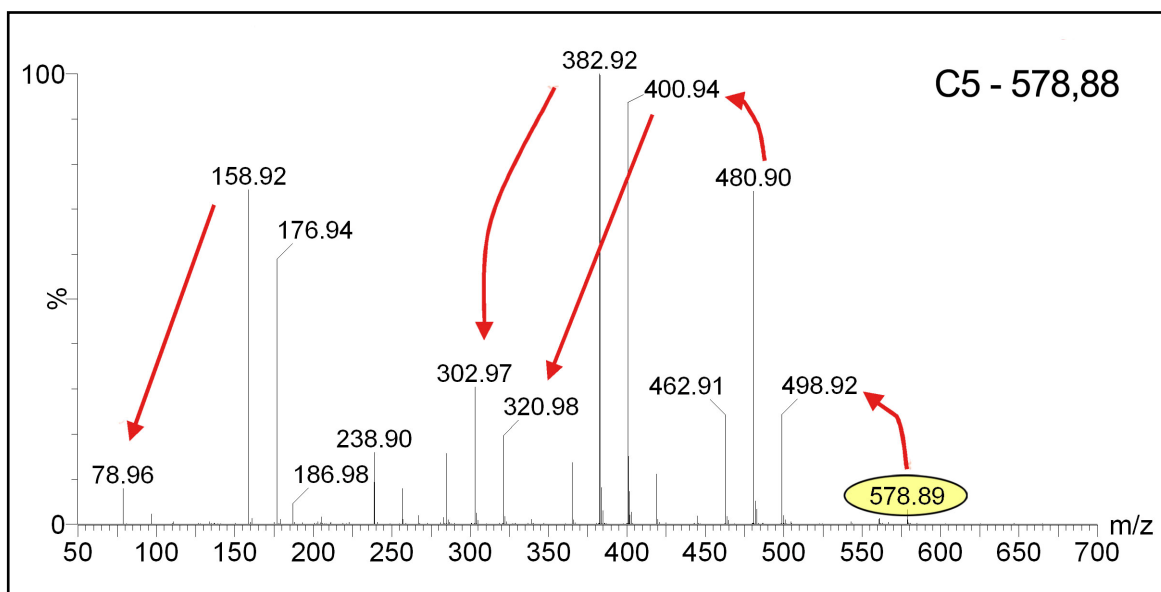


Abbildung 21: Detailliertes Fragmentspektrum (1) des manuell ausgewählten Peaks 578,88 Da

Fragmentspektrum des Peaks 578,88 (nach manueller Auswahl als 578,89 gemessen; eingekreist und gelb unterlegt) aus Fraktion VI.C5. Aufgetragen sind die Intensitäten (in %) der einzelnen Peaks in Abhängigkeit von ihren Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z hier einfach geladene Moleküle). Die roten Pfeile zeigen die Massendifferenzen von 80 Da zwischen einzelnen Peaks (einer Phosphatgruppe entsprechend).

Das Fragmentspektrum (Abb. 21) zeigt die Massen der Bruchstücke der manuell ausgewählten Substanz mit der Masse 578,88/578,89 Da aus Abb. 20. In Abb. 22 sind die Massendifferenzen von 80 Da mit roten Pfeilen zwischen einzelnen Peaks hervorgehoben. Das Experiment zeigt, dass durch die Kollision mit Argonatomen offensichtlich mehrere Phosphatgruppen aus der Zielsubstanz abgespalten werden. Das Fragmentspektrum weist eine zweite Massendifferenz aus, die 18 Da beträgt und in Abbildung 22 mit blauen Pfeilen zwischen mehreren Peaks markiert ist.

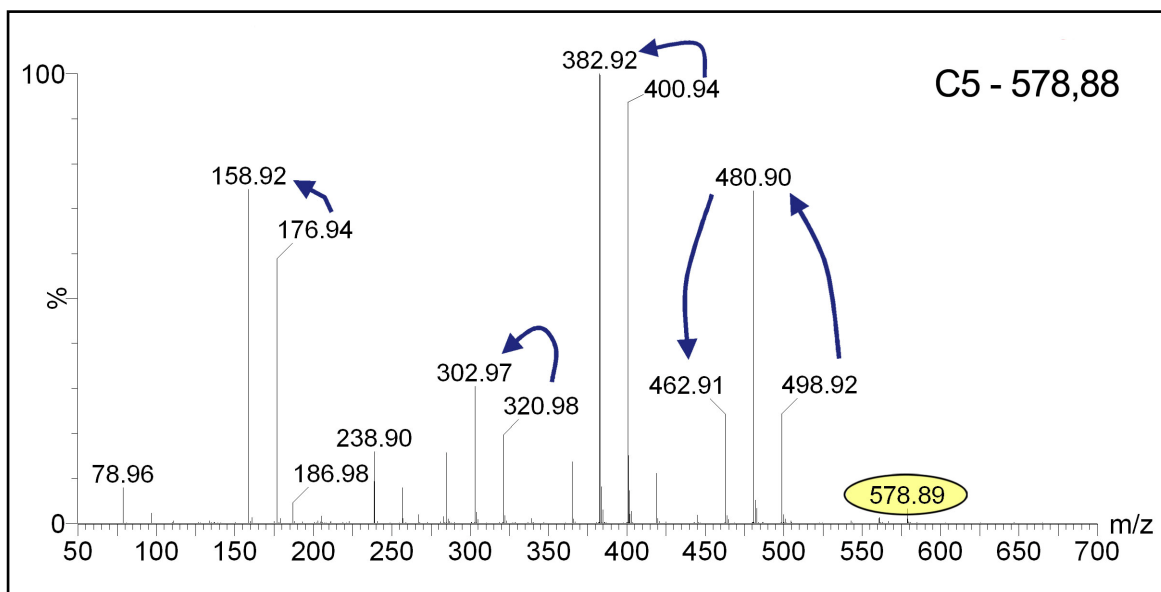


Abbildung 22: Detailliertes Fragmentspektrum (2) des manuell ausgewählten Peaks 578,88 Da

Fragmentspektrum des Peaks 578,88 entsprechend Abb. 21, hier mit blauen Pfeilen hervorgehoben die Massendifferenzen von 18 Da zwischen einzelnen Peakgruppen (entspricht der Differenz eines H₂O-Moleküls).

Massendifferenzen von 18 Da sprechen für die Abspaltung von H₂O in der Fragmentierungsreaktion. Die Darstellung in Abbildung 22 legt nahe, dass die fragmentierte Substanz mehrere Hydroxylgruppen enthält.

Weitere Fragmentierungen wurden außerdem mit den anderen Hauptpeaks aus den oben aufgeführten Übersichtsspektren (Abb. 20) durchgeführt u.a. mit dem Peak 498,91 Da aus der Fraktion VI.C5.

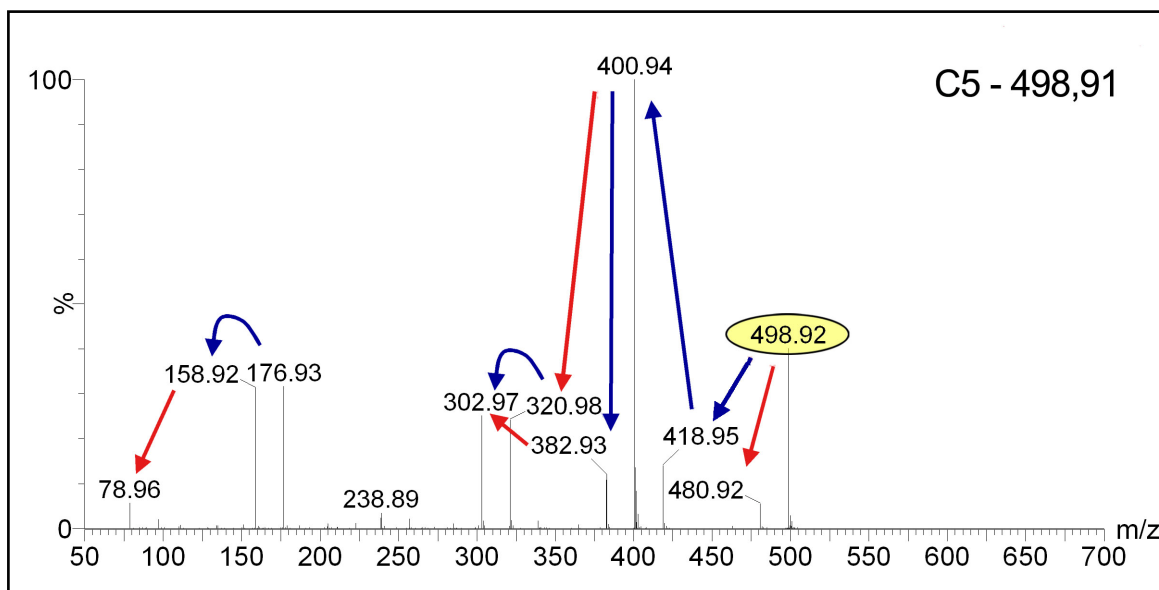


Abbildung 23: Detailliertes Fragmentspektrum des manuell ausgewählten Peaks 498,91 Da

Fragmentspektrum des Peaks 498,91 (hier 498,92; eingekreist und gelb unterlegt) aus Fraktion VI.C5. Die Darstellung entspricht der in Abb. 22. Die blauen Pfeile symbolisieren die Massendifferenz von 18 Da (Abspaltung von H₂O) und die roten Pfeile symbolisieren die Massendifferenz von 80 Da (Abspaltung von HPO₃).

Auch bei der Fragmentierung des Peaks 498,91 Da treten die Massendifferenzen von 18 Da und 80 Da auf, auch hier sollte die Zielsubstanz mehrere Phosphat- und Hydroxylgruppen enthalten. Zudem fällt ins Auge, dass die Fragmentierungsmuster aus Abbildung 22 und 23 sich sehr ähneln; viele Bruchstücke beider Substanzen haben identische Massen. Bei den ausgewählten Substanzen der Massen 498,92 und 578,88 Da handelte es sich folglich um zwei Substanzen mit sehr ähnlicher chemischer Zusammensetzung, die sich scheinbar hauptsächlich in einer Phosphatgruppe unterscheiden.

Zusammenfassend haben die massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt, dass sich die am stärksten vertretenen Substanzen des Aufreinigungsschritts VI. aus einer Substanzfamilie kommen, die Hydroxyl- und Phosphatgruppen enthält und deren einzelne Substanzen sich voneinander in der Anzahl der Phosphatgruppen unterscheiden.

Nun galt es, die Frage zu beantworten, um welche Substanzfamilie es sich dabei handelt. Nachdem Nukleotide bereits wegen fehlender Aktivität im TcdB-Spaltungsassay ausgeschlossen waren, rückten Zuckermoleküle in den Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen. Bei Literaturrecherchen fiel eine Veröffentlichung auf, in der massenspektrometrische Fragmentierungen mit Inositolphosphaten (IPs) präsentiert wurden (Hsu et al. 2003). Bei Inositolphosphaten handelt es sich um Substanzen, die nicht nur die geforderte Abspaltung von Phosphat-/Hydroxylgruppen erfüllen, sondern deren

Fragmentspektren auch denen in den Abb. 20-24 entsprechen. Daraufhin wurde Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat als Vergleichssubstanz in Fragmentierungsversuche eingesetzt.

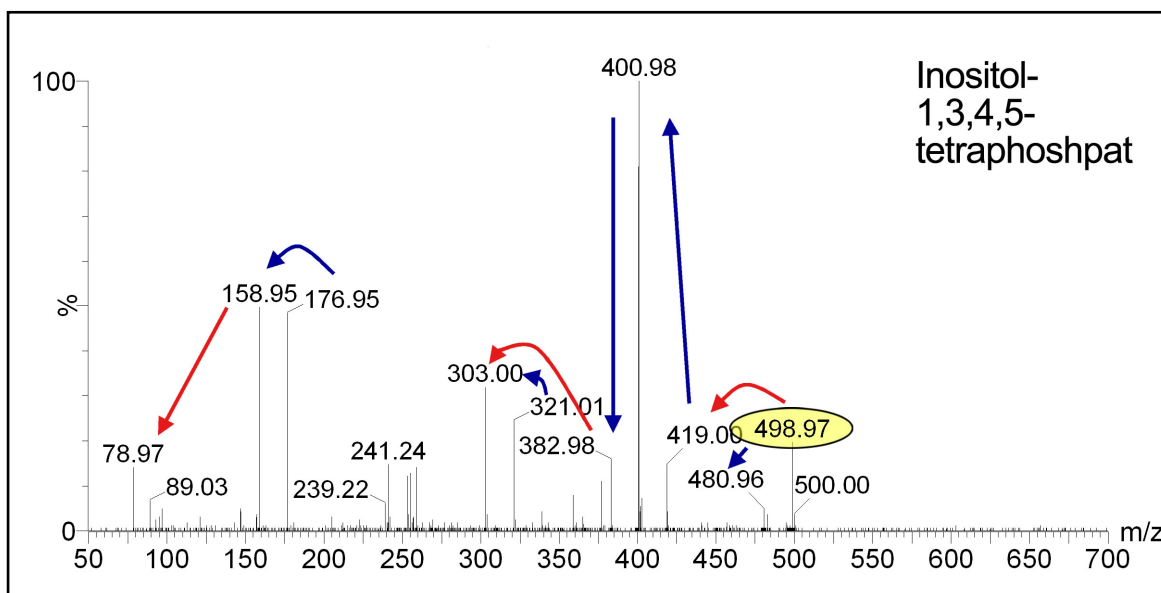


Abbildung 24: Fragmentspektrum von gekauftem Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat

Fragmentspektrum von Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat (498,97 Da, eingekreist und gelb unterlegt). Die Darstellung entspricht der in Abb. 22. Die blauen Pfeile symbolisieren erneut Massendifferenzen von 18 Da (Abspaltung von H_2O) und die roten Pfeile symbolisieren die Massendifferenz von 80 Da (Abspaltung von HPO_3).

Die Fragmentierung des gekauften Inositol-1,3,4,5-phosphats erzeugte ein Spektrum, in dem die erwarteten 18 und 80 Da Massendifferenzen auftreten, zurückzuführen auf Hydroxyl- und Phosphatgruppen, die aus dem Inositolphosphat abgespaltene waren.

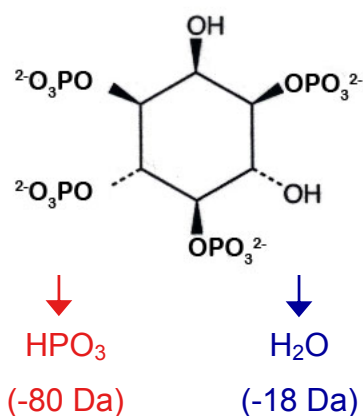


Abbildung 25: Abspaltung von H_2O und HPO_3 am Beispiel von Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des Inositol-1,3,4,5-tetraphosphats. Bei der Fragmentierung durch Kollision mit Argonatomen kommt es zur Abspaltung von Phosphatgruppen (HPO_3 , 80 Da, roter Pfeil) und Hydroxylgruppen (H_2O , 18 Da, blauer Pfeil); das entsprechende Fragmentierungsspektrum ist Abb. 25 zu entnehmen.

Die große Übereinstimmung der Fragmentierungsspektren der Abbildung 23 (Substanz aus der Reinigungsstufe VI) und der Abbildung 24 (gekauft Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat) lässt den Schluss zu, dass es sich um identische Substanzen handelt. Blieb an diesem Punkt zu klären, ob die sehr gute Aktivität der entsprechenden Fraktionen der Milzzellaufreinigungen im TcdB-Spaltungsassay auch tatsächlich durch Inositolphosphate hervorgerufen wurde.

4.5 Einsatz von Inositolphosphaten im TcdB-Spaltungsassay

Inositol ist ein Zucker mit sechs Hydroxylgruppen, die durch Phosphatgruppen substituiert werden können. Entsprechend gibt es dreiundsechzig mögliche Isomere, je nachdem welche Positionen und wie viele Hydroxylgruppen durch Phosphatgruppen substituiert sind. Nachdem die massenspektrometrischen Untersuchungen deutlich gezeigt hatten, dass die Hauptpeaks der aufgereinigten Milzzellfraktionen Inositolphosphate sein sollten, wurde eine Anzahl käuflich erhältlicher Inositolphosphate auf ihre mögliche Aktivität im TcdB-Spaltungsassay getestet. Zunächst wurde Inositolhexaphosphat (IP6) analysiert, die Abbildung 27 zeigt einen Versuch, in dem verschiedene Inositolhexaphosphatkonzentrationen (μM) in den TcdB-Spaltungsassay eingesetzt wurden.

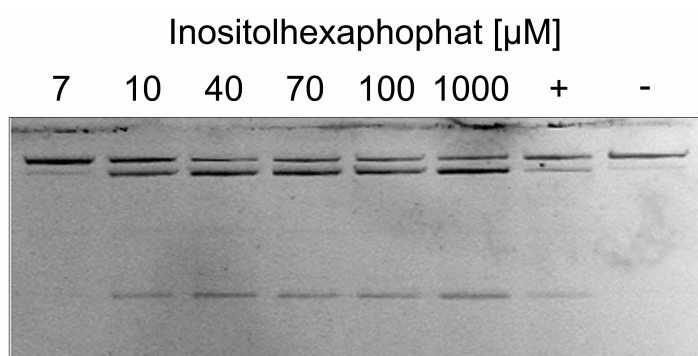


Abbildung 26: Einsatz von Inositolhexaphosphat im Spaltungsassay mit Cy3-markiertem Toxin B

Inositolhexaphosphat wurde in den angegebenen Konzentrationen (μM) im TcdB-Spaltungsassay auf Cy3-markiertem Toxin B getestet. Als Positivkontrolle (+) diente Fraktion VI.C4 aus der Aufreinigung der Milzextrakte. Die Negativkontrolle (-) bestand aus Toxin versetzt mit Puffer. Die Darstellung zeigt die Zink-Färbung des SDS-PAGE.

Abb. 26 macht deutlich, dass die Zugabe von Inositolhexaphosphat zur Spaltung von Toxin B führt. Bis zu einer Konzentration von 10 μM fand diese TcdB-Spaltung statt.

Dieses Ergebnis beweist, dass bei den massenspektrometrischen Untersuchungen in der Tat mit den Inositolphosphaten (hier IP6) die aktiven zytosolischen Substanzen identifiziert worden waren.

Mit dem Wissen, dass Inositolphosphat die Spaltung induziert, wurde es dann möglich, die nachfolgenden Experimente mit unmarkiertem Toxin B durchzuführen, die Sensitivitätssteigerung durch Nutzung von Cy3-TcdB war bei Verwendung käuflichen IPs nicht mehr erforderlich. Entsprechend wurden dann zur Darstellung des Toxins und seiner Spaltprodukte in Gelen Zinkfärbungen eingesetzt.

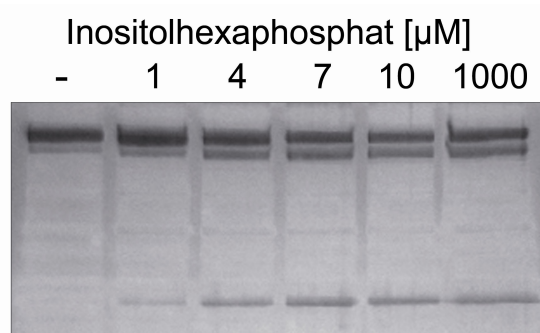


Abbildung 27: Unmarkiertes TcdB im TcdB-Spaltungsassay unter Zusatz von Inositolhexaphosphat

Inositolhexaphosphat wurde in den angegebenen Konzentrationen (μM) im TcdB-Spaltungsassay auf seine Wirksamkeit auf unmarkiertem Toxin B getestet. In der Negativkontrolle (-) wurde dem Toxin nur Puffer zugesetzt. Die Darstellung zeigt die Zink-Färbung des SDS-PAGE.

Aus Abb. 27 ist zu erkennen, dass bei Verwendung unmarkierten Toxins im TcdB-Spaltungsassay die Spaltung sogar noch bei 1 μM Inositolhexaphosphat stattfindet. Im Falle der Spaltung von Cy3-markiertem Toxin B erforderte die Spaltung eine IP6-Konzentration von 7 μM (s. Abb. 26). Dieser Unterschied ist sicher Folge der Cy3-Markierung des TcdB, durch die die Struktur des TcdB verändert wird und die damit Einfluss auf die Spaltung nimmt.

Andere käufliche Inositolphosphate wurden nachfolgend systematisch auf ihre Wirkung im TcdB-Spaltungsassay getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es fällt auf, dass einige der getesteten Inositolphosphate nicht in der Lage waren, die Spaltung von Toxin B zu induzieren, bzw. dass die benötigten Konzentrationen höher sind. Inositolhexaphosphat ist das Isomer mit der höchsten Aktivität.

Tabelle 3: Wirkung von käuflichen Inositolphosphaten auf die Effektivität der TcdB-Spaltung

Verschiedene Inositolphosphat-Isomere wurden im Spaltungsassay mit Cy3-markiertem Toxin B getestet. (-) gibt an, dass keine Spaltung mit dieser Inositolphosphat-Konzentration induziert wurde; (+) gibt an, dass Toxin B bei dieser Inositolphosphat-Konzentration gespalten wurde.

Inositolphosphat-Isomer	Konzentration in μM		
	1000	100	10
1,5	-	-	-
1,4	-	-	-
4,5	-	-	-
1,4,5	-	-	-
1,3,5	-	-	-
2,3,5	-	-	-
1,3,5,6	-	-	-
1,2,3,4,6	-	-	-
1,3,4	+	-	-
3,4,6	+	-	-
1,3,4,5	+	-	-
1,2,3,4	+	-	-
1,2,3,4,5	+	-	-
1,4,5,6	+	+	-
3,4,5,6	+	+	-
1,2,3,5,6	+	+	-
1,3,4,5,6	+	+	-
2,3,4,5,6	+	+	-
1,2,3,4,5,6	+	+	+

Die in Tabelle 3 zusammengefassten Ergebnisse runden die Beweisführung über die Natur der zytosolischen Substanzen ab, die die TcdB-Spaltung induzieren. Die eingesetzten Substanzen sind mit den durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesenen Substanzen identisch.

Da Inositolphosphate selbst jedoch keine proteolytische Aktivität besitzen und durch das Fehlen von Pyrophosphatgruppen nicht in der Lage sind, Proteine zu phosphorylieren, war die Frage, welches Enzym die Spaltung des TcdB ausführt, noch nicht geklärt.

4.6 Biochemische Untersuchungen zur Natur des spaltenden Enzyms

Nach Rupnik et al. (2005) war bekannt, dass die Spaltungsreaktion durch Pepstatin A, ein Aspartatprotease-Inhibitor, blockiert werden kann. Die Inhibierung der TcdB-Spaltung nach Zusatz von Pepstatin A konnte dann auch für die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Experimente bestätigt werden. Unter Gegenwart des Inhibitors und Inositolhexaphosphat wurde TcdB nicht gespalten (Daten nicht gezeigt). Da in dem Spaltungsassay lediglich Toxin B und Inositolphosphat enthalten waren, verblieben nur zwei Erklärungsmöglichkeiten. Entweder (i) war in der Toxin B-Präparation, die aus *C. difficile* Kulturüberständen aufgereinigt worden war, eine kontaminierende Protease enthalten, oder (II) das Toxin B selbst trägt eine intrinsische Proteaseaktivität und wirkt autoproteolytisch.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt.

4.6.1 Toxin B-Präparation in der Massenspektrometrie

Die verwendete Toxin B-Präparation hatte bereits eine im SDS-PAGE ermittelte abgeschätzte Reinheit von 98 %. Um die Anwesenheit jedweder Endoprotease ausschließen zu können, wurden 10 µg der Toxin B-Präparation auf SDS-PAGE aufgetrennt, alle nachweisbaren Banden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und im Massenspektrometer analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden abgeglichen und ergaben folgende Genbank Accessions No:

GI:	Funktion:
10968908	putative deoxyribonuclease
90575304	hypothetical protein CdifQ_02001420
90573728	hypothetical protein CdifQ_02002991
90572914	23S rRNA methyltransferase/RumA
90573536	adenine phosphoribosyltransferase
90574567	ABC transporter-associated permease
90573292	outer surface protein
90572689	putative ATP/GTP-binding protein
90574791	rubredoxin/flavodoxin/oxidoreductase
90573731	NADH:flavin oxidoreductase
90573329	N-6 DNA methylase:Type I restriction-modification system, M subunit
90573648	involved in spore envelope assembly
90573322	hypothetical protein CdifQ_02003347
90575722	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase
90573323	DEAD/DEAH box helicase, N-terminal
90575780	Carbon-monoxide dehydrogenase, catalytic subunit
3990798	AR000648 Sequence 30 from patent US 5736139 tcdB
90573593	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-like protein
54781343	2-hydroxyacyl-CoA dehydratase
118535	DHE2_CLODI NAD-specific glutamate dehydrogenase (NAD-GDH)
14456050	TcdB-C34 Cluster1-2

Alle Proteine fanden sich in dem veröffentlichten Genom von *C. difficile* (Sebahia et al. 2006) und stimmten mit den dort gefunden Sequenzen überein. Es wurde keine Übereinstimmungen zu bekannten Endoproteasen gefunden. Dieses Ergebnis machte die Kontamination der eingesetzten Toxin B-Präparation mit einer eigenständigen Protease äußerst unwahrscheinlich.

4.6.2 Affinitätsreinigung von TcdB

Ein alternativer Zugang, etwaige kontaminierende Proteasen zu entfernen, war, TcdB einer zusätzlichen Affinitätsreinigung durch eine mit monoklonalen Antikörper 2CV gekoppelten HiTrap Sepharose-Affinitätssäule zu unterziehen. 2CV ist ein Antikörper, der spezifisch an die Ligandendomäne von Toxin B bindet (Sauerborn et al. 1994). Die Affinitätsreinigung des TcdB mit einer 2CV-Säule sollte zu einer hochreinen Toxin B-Präparation führen. Mit dem so gewonnenen Material wurde untersucht, ob dessen Spaltung unverändert durch Inositolhexaphosphat induziert werden konnte.



Abbildung 28: Spaltung von affinitätsgereinigtem Toxin B unter Zusatz von Inositolhexaphosphat

Unmarkiertes affinitätsgereinigtes Toxin B wurde im TcdB-Spaltungsassay mit Inositolhexaphosphat (IP6, 100 μ M) versetzt. In der Negativkontrolle (-) wurde statt Inositolphosphat Puffer eingesetzt. Die Darstellung der Proteine nach SDS-PAGE-Auftrennung erfolgte durch Zink-Färbung.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen, wurde das affinitätsgereinigte Toxin B weiterhin in der Inositolhexaphosphat-induzierten Reaktion gespalten. Da extrinsische Proteasen nicht an den spezifischen monoklonalen Antikörper binden sollten, ergab auch dieser Versuch, dass unsere TcdB-Präparation keine kontaminierende Protease enthielt.

4.6.3 Test auf unspezifische Proteolyse

Im Falle, dass es sich um eine zufällig mit Toxin B aus dem *C. difficile* Überstand aufgereinigte extrinsische Protease handelte, sollte diese auch unspezifische Spaltreaktionen herbeigeführt haben. Demzufolge hätte die Protease nach Inositolhexaphosphat-Aktivierung nicht nur Toxin B, sondern auch andere externe Proteine spalten sollen. Zum Ausschluss dieser Möglichkeit wurden Inositolhexaphosphat-aktivierten Toxin B-Präparationen von außen externe Proteine zugesetzt, um deren Verdau als Anzeichen für die Gegenwart einer extrinsischen Protease werten zu können.

Toxin B wird zwischen den Aminosäuren Leucin₅₄₃ und Glycin₅₄₄ (Rupnik et al. 2005) gespalten. Als Kontroll-Protease wurde Papain gewählt, denn Papain schneidet ebenfalls spezifisch zwischen Leucin und Glycin und konnte so als direkte Kontrolle eingesetzt werden, dass die ausgewählten externen Proteine verdaubar waren.

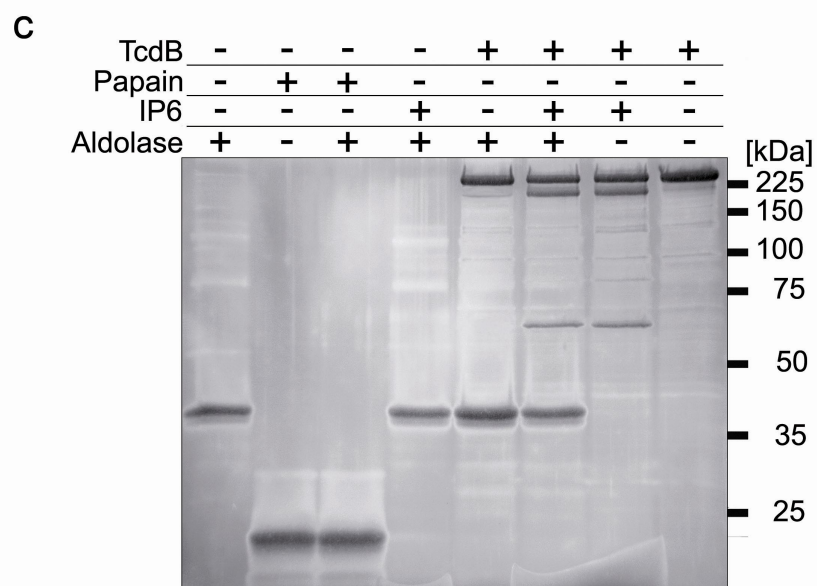
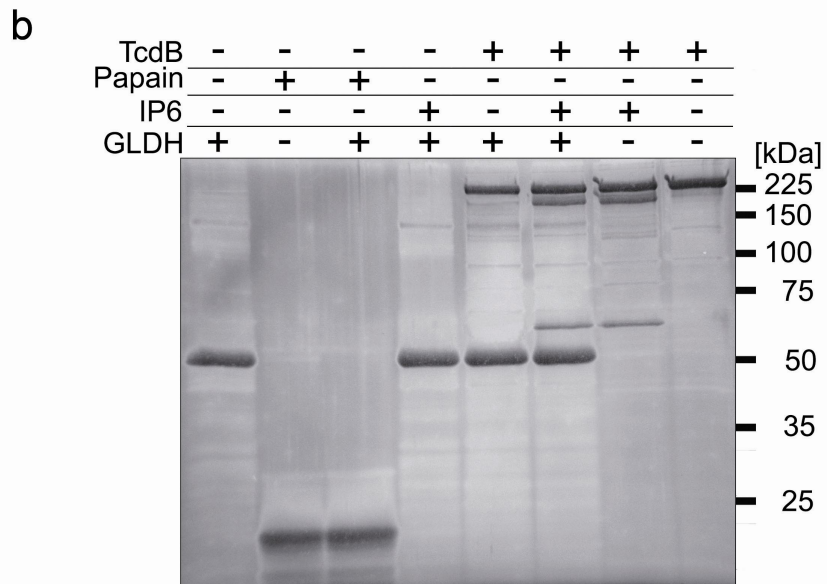
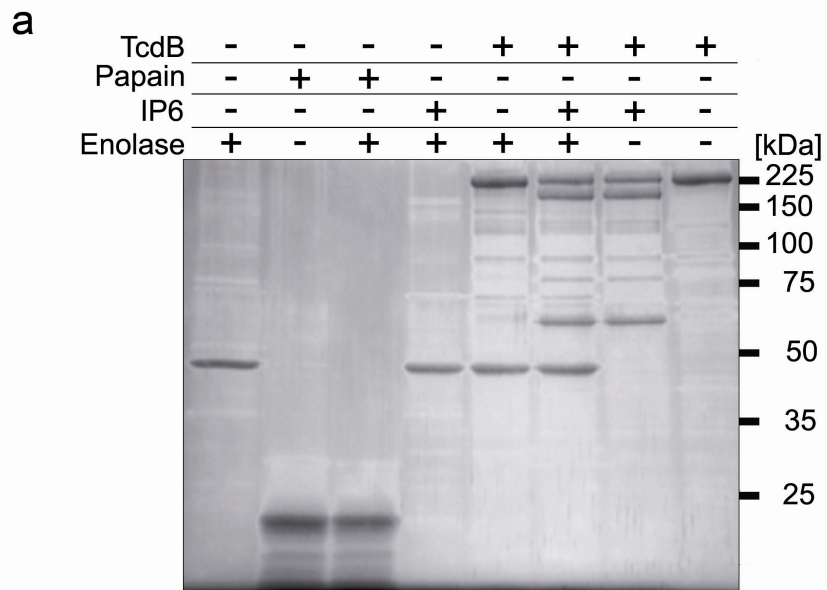


Abbildung 29: Versuch des Nachweises extrinsischer Proteasen durch externen Zusatz von Proteinen

Die Abbildung zeigt den externen Zusatz anderer Proteine (Enolase, Aldolase, Glutamatdehydrogenase (GLDH)) zur Toxin B-Präparation, um in dieser Präparation die Gegenwart unspezifischer Proteasen nachzuweisen. Papain diente als Kontroll-Protease und Inositolhexaphosphat (IP6) als Induktor der Spaltreaktion. Als unspezifisches Protein diente (a) Enolase (b) Aldolase (c) Glutamatdehydrogenase (GLDH). (+) symbolisiert die Anwesenheit, (-) die Abwesenheit der jeweiligen im Kopf der Abbildung angeführten Substanz. Die Darstellung zeigt die Zink-Färbung des SDS-PAGE.

Aus Abbildung 29 ist zu ersehen, dass Enolase, Aldolase und Glutamatdehydrogenase durch Papain vollständig verdaut werden, die Positivkontrolle demnach durchweg funktionierte. Sowohl Inositolhexaphosphat als auch Toxin B alleine, mit dem jeweiligen externen Protein, führten zu keiner Proteolyse. Das Experiment zeigt, dass auch die durch Inositolhexaphosphat aktivierte Toxin B-Präparation nicht in der Lage war, externe Proteine zu schneiden.

Aus diesem Experiment konnte geschlossen werden, dass es sich bei der Toxin B-Spaltung um eine spezifische Reaktion handelt, an der keine extrinsische Protease beteiligt ist.

4.6.4 Untersuchung der Trans-Reaktivität IP6-aktivierter Toxin B-Präparationen

Vorversuche mit dem ebenfalls von *C. difficile* produzierten Toxin A hatten gezeigt, dass auch dieses Toxin durch Inositolhexaphosphat gespalten wird, allerdings waren dazu IP6-Konzentrationen über 10 mM (statt 10 μ M wie bei TcdB) erforderlich. Natürlich stellte sich auch für TcdA die Frage, ob eine kontaminante Protease für diese Inositolhexaphosphat-induzierte Spaltung verantwortlich ist. Diese putative TcdA-begleitende Protease müsste in dem Fall in geringerer Konzentration vorliegen und demzufolge mehr Inositolhexaphosphat benötigen. Folgt man dieser Argumentation, so enthielte die TcdB-Präparation mehr von der externen Protease, würde weniger IP6 zu ihrer Aktivierung benötigen und könnte damit TcdA im Kreuzversuch spalten.

Der skizzierte Versuch wurde durchgeführt, indem Cy3-markiertes Toxin A mit unmarkiertem Toxin B und Inositolhexaphosphat zur Reaktion gebracht wurde. Das Gel wurde anschließend sowohl im Fluoreszenzimager zur Dokumentation der TcdA-gebundenen Cy3-Fluoreszenz aufgenommen als auch der Zink-Färbung unterzogen, um alle Proteine beurteilen zu können.

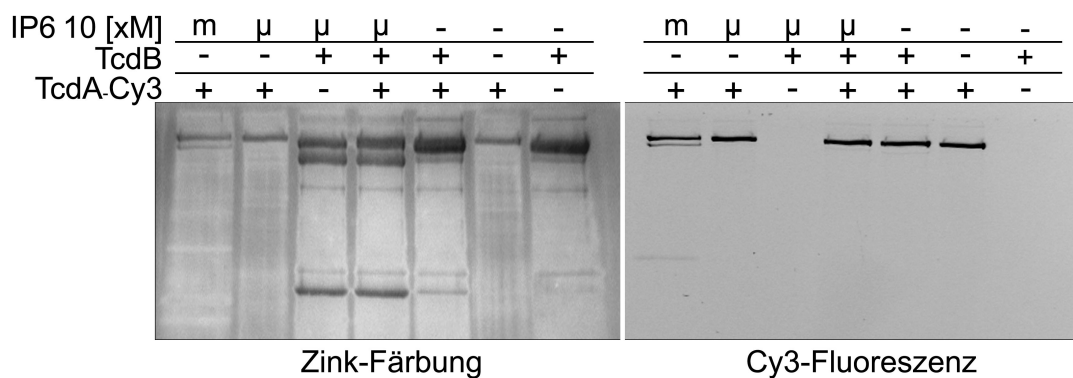


Abbildung 30: Auswirkung von Inositolhexaphosphat-aktivierten Toxin B-Präparationen auf Toxin A

Die Spaltung von Cy3-markiertem Toxin A (TcdA-Cy3) wurde durch 10 mM Inositolhexaphosphat (IP6) induziert, die Spaltung von unmarkiertem Toxin B (TcdB) mit 10 μM. Das gleiche Gel wurde für die Dokumentation der Cy3-Fluoreszenz des Toxin A im Fluoreszenzimager betrachtet (Cy3-Fluoreszenz) und Zink-gefärbt, um unmarkiertes Toxin B zu visualisieren. Getestet wurde, ob eine durch 10 μM Inositolhexaphosphat voraktivierte Toxin B-Präparation in der Lage ist, Toxin A zu spalten. Die IP6-Konzentrationen sind im Kopf der Abbildung angegeben, m steht für 10 mM, μ für 10 μM; in Ansätzen mit einem (-) wurde die entsprechende Komponente nicht eingesetzt; Ansätze mit einem (+) enthalten den links angeführten Bestandteil.

In der Fluoreszenzaufnahme ist zu erkennen, dass das Toxin A durch Zugabe von 10 mM Inositolhexaphosphat gespalten wurde, nicht aber durch Zusatz der geringen Konzentration von nur 10 μM Inositolhexaphosphat. Die putative Protease in der Toxin B-Präparation wurde, wie aus der Zink-Färbung ersichtlich, bereits unter Gegenwart von 10 μM Inositolhexaphosphat im Sinne der TcdB-Spaltung aktiviert. Die Spaltung blieb aus, wenn Inositolhexaphosphat im Ansatz fehlte, aber auch wenn Toxin A und B in Kombination eingesetzt wurden.

Entscheidend ist der Versuch, bei dem Toxin A zu Inositolhexaphosphat-aktivierten Toxin B-Präparationen zugesetzt wurde. Die Reaktion von beiden Toxinen unter Gegenwart von IP6 führte zur Spaltung allein von Toxin B, eine Spaltung von Toxin A blieb aus, wie deutlich in der Fluoreszenzaufnahme zu sehen ist.

Bei Gegenwart einer kontaminierenden Protease in der Toxin B-Präparation hätte man erwartet, dass Toxin A in Anwesenheit von 10 μM Inositolhexaphosphat gespalten wird, so wie es für TcdB zu sehen ist. Gemeinsam im Ansatz vorhandene Proteasen hätten die Spaltung beider Toxine bewirken müssen. Dass eine für Toxin A spezifische Inositolphosphat induzierbare kontaminierende Protease zufällig mit Toxin A aufgereinigt wurde, und eine zweite Toxin B-spezifische bei dessen Aufreinigung, ist als höchst unwahrscheinlich anzusehen.

Die Versuche dieses wie auch des vorangegangenen Kapitels sprechen eindeutig gegen die Gegenwart einer extrinsischen Protease und favorisieren stattdessen das Modell der autokatalytischen Spaltung der *C. difficile* Toxine A und B.

4.6.5 Inter- oder intramolekulare Reaktion?

Die weiteren Versuche wurden unter der Hypothese durchgeführt, dass es sich bei der IP6-induzierten Spaltung des TcdB um einen autokatalytischen Prozess handelt. Eine autokatalytische Spaltung des Toxins wäre eine intramolekulare Reaktion, da die Spaltung durch eine intrinsische Protease katalysiert würde. Im Falle einer kontaminanten Protease würde es sich bei der Spaltung des Toxins demgegenüber um eine intermolekulare Reaktion handeln.

Nach dem Ziegler-Ruggli-Verdünnungsprinzip (Ziegler 1955) werden intramolekulare Reaktionen in verdünnter Lösung favorisiert, denn die Wahrscheinlichkeit, dass Enden oder Teile des Moleküls zueinander finden, ist von der Konzentration des Moleküls unabhängig. Im Gegensatz dazu sinkt in Verdünnungen die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Moleküle zusammentreffen (intermolekulare Reaktion).

Um die Hypothese der autokatalytischen Proteolyse von Toxin B zu untermauern, wurde Toxin B daher in der bis dahin genutzten Konzentration von 5 μM sowie in einer 1:100-Verdünnung (0,05 μM) im Spaltungsassay mit Inositolhexaphosphat getestet.

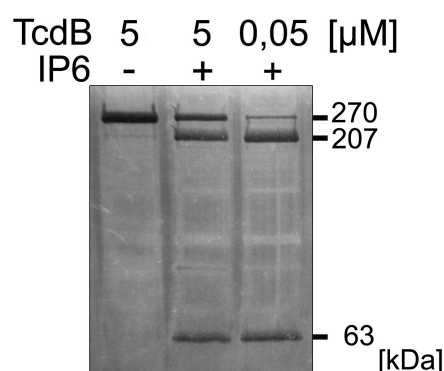


Abbildung 31: IP6-induzierte Spaltung in Abhängigkeit der TcdB-Konzentration

Toxin B wurde im Spaltungsassay in den beiden Konzentrationen 5 μM bzw. 0,05 μM eingesetzt. Die Spaltung wurde durch Zusatz von Inositolhexaphosphat (IP6, 100 μM) induziert. (-) symbolisiert die Abwesenheit, (+) das Zusetzen der jeweiligen Substanz. Die Darstellung zeigt die Zink-Färbung des SDS-PAGE.

Wie aus den Spaltungsassays der vorangegangenen Versuche zu ersehen ist, wurde Toxin B niemals vollständig gespalten. Es blieb immer ein deutlicher Anteil an ungespaltenem

Holotoxin übrig. Im vorliegenden Versuch (s. Abb. 31) zeigte der Spaltungsassay bei der Toxin B-Konzentration von 0,05 μM deutlich weniger Reste an Holotoxin im Vergleich zu der vorher genutzten Konzentration von 5 μM . Ausverdünnung (von 1:100) führt demnach zu effizienterer Spaltung des Toxins. Da es sich nach dem Ziegler-Ruggli-Verdünnungsprinzip um eine in Verdünnung favorisierte Reaktion handelte, musste es sich bei der Spaltung des Toxins demnach um eine intramolekulare Reaktion handeln.

4.7 Identifizierung des katalytischen Zentrums

Alle im voranstehenden Text durchgeführten Versuche weisen deutlich auf eine im Toxin lokalisierte intrinsische Protease hin. Den Beweis für diese Hypothese konnte nur die Identifizierung der intrinsischen Protease liefern. Der Wegweiser für die weiteren Experimente war die Inhibierung der Spaltreaktion durch Pepstatin A, die auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Pepstatin A inhibiert spezifisch Aspartatproteasen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei der intrinsischen TcdB-Protease um eine Aspartatprotease handelt. Eine wichtige Eigenschaft von Aspartatproteasen ist das konservierte Motiv im katalytischen Zentrum, das aus dem Tripeptid DSG oder DTG besteht (Rao et al. 1998). In Toxin B finden sich drei dieser DSG-Motive an den Positionen 1665, 2001 und 2133.

Um die Protease zu inhibieren, kamen prinzipiell zwei experimentelle Ansätze in Frage: die Blockade durch chemische Modifikation oder aber die zielgerichtete Mutation des Motivs mit Hilfe von rekombinanter DNA-Technologie. Da *C. difficile* DNA mit 27 % einen sehr geringen GC-Gehalt hat, *E. coli* demgegenüber aber einen GC-Gehalt von ca. 50 % aufweist, wird *C. difficile* DNA in *E. coli* nur sehr schlecht exprimiert. Expressionssysteme in *C. difficile* selber waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar, so dass der Zugang über chemische Mutagenese gesucht wurde.

4.7.1 EPNP-Modifizierung von Toxin B

Neben Pepstatin A war aus der Literatur EPNP (1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan) als ein weiterer spezifischer Aspartatproteasen-Inhibitor bekannt (Yu et al. 1996). Anders als

Pepstatin A bindet EPNP kovalent an das Aspartat im katalytischen Zentrum der Protease und inhibiert Aspartatproteasen auf diese Weise. Die kovalente Bindung von EPNP an das D(S/T)G-Motiv erhöht das Molekulargewicht der Protease um 195 Da, entsprechend dem Gewicht von EPNP. Eine solche Massendifferenz kann im Massenspektrometer detektiert werden. So konnte durch Modifizierung der HIV-Protease II mit EPNP deren katalytisches Zentrum lokalisiert werden (Salto et al. 1994).

Dieser Zugang erschien auch für die Identifizierung der Toxin B-intrinsischen Protease als geeignet. Toxin B wurde daher mit EPNP modifiziert und anschließend getestet, ob die Spaltungsreaktion danach inhibiert ist.

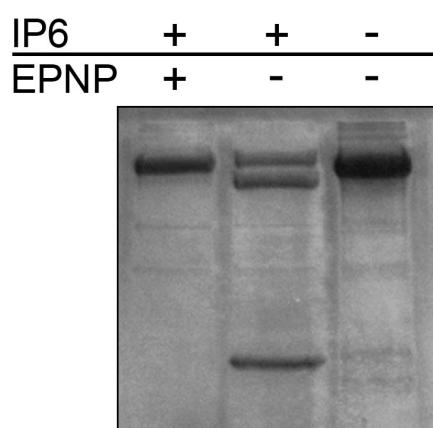


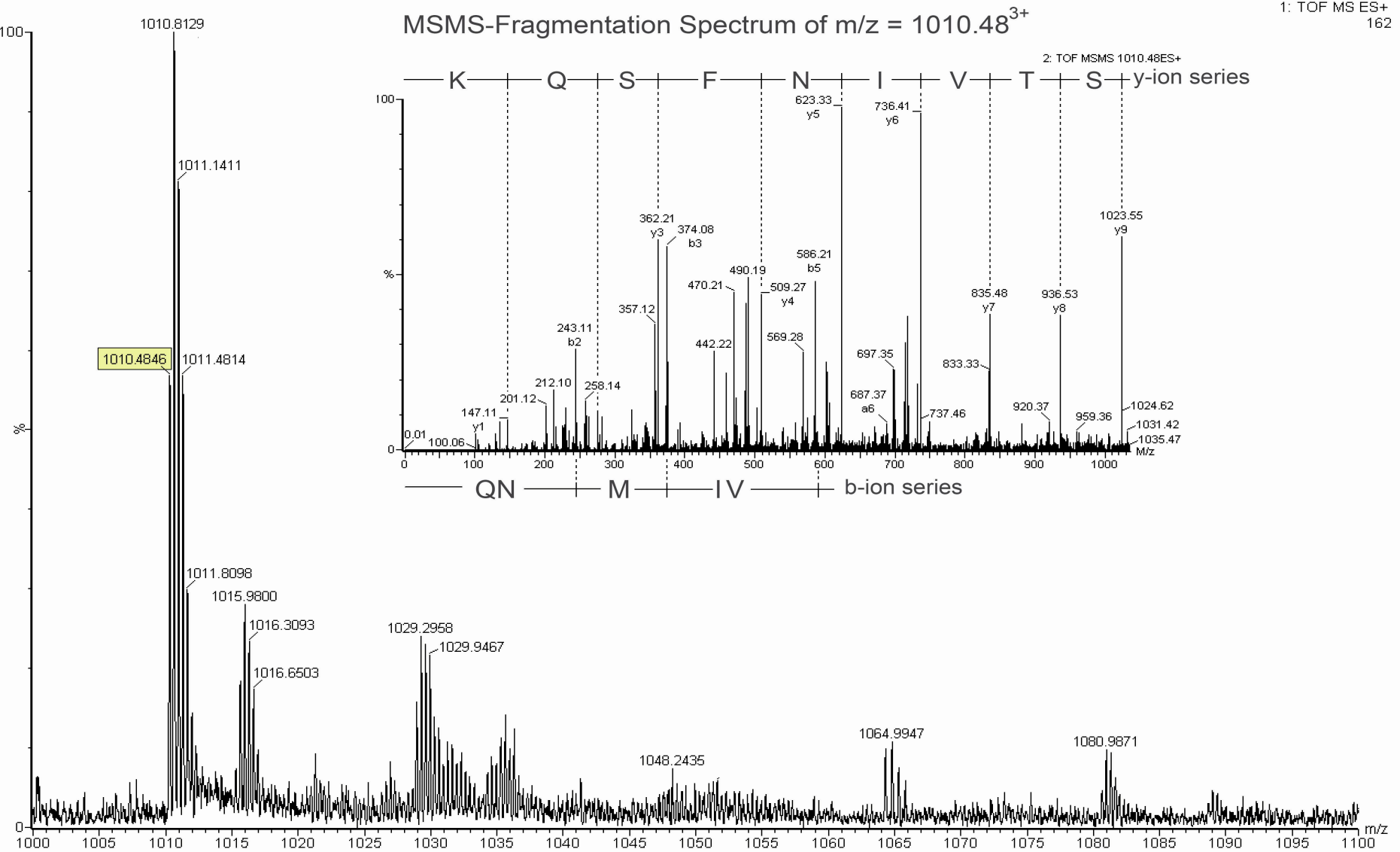
Abbildung 32: Auswirkung von EPNP auf die induzierte Spaltung von TcdB

Toxin B wurde mit (+) oder ohne (-) EPNP (5 mM) modifiziert und mit (+) oder ohne (-) Inositolhexaphosphat (100 μ M) in die Spaltreaktion eingesetzt. Das Bild zeigt eine Zink-Färbung nach SDS-PAGE Auftrennung der Reaktionsprodukte.

Aus Abbildung 32 ist zu entnehmen, dass EPNP-modifiziertes Toxin B nicht durch Zugabe von Inositolhexaphosphat gespalten werden kann.

Es war deshalb davon auszugehen, dass EPNP kovalent an das Aspartat im katalytischen Zentrum der Protease gebunden hatte, so dass die Protease um 195 Da schwerer geworden sein musste. EPNP-modifiziertes und unmodifiziertes Toxin B wurde mit Trypsin verdaut und die Fragmente in der Massenspektrometrie analysiert. Ziel war es, in den Fragmenten des EPNP-modifizierten Toxins, im Vergleich zu den Fragmenten des unmodifizierten Toxins, eine Erhöhung der Masse um 195 Dalton zu finden. Durch vergleichende Sequenzierung des modifizierten versus des unmodifizierten Fragments sollte das aktive Zentrum der Aspartatprotease bestimmt werden. Bei identischer Sequenz wäre bewiesen, dass die Massenveränderung durch EPNP verursacht wurde, gleichbedeutend der Identifizierung des katalytischen Zentrums von TcdB.

a



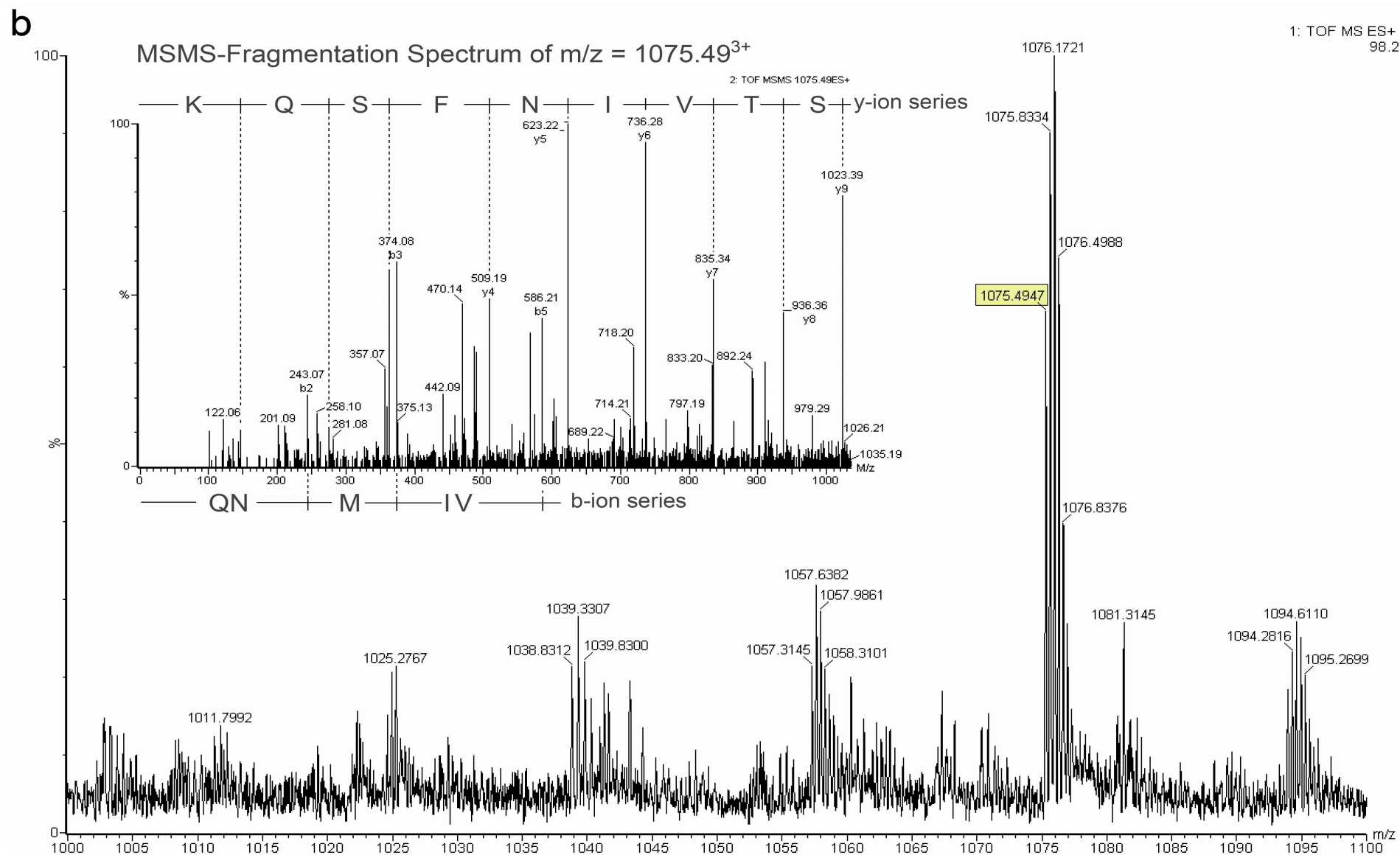


Abbildung 33: Massenspektroskopische Analyse tryptischer Fragmente von EPNP-modifiziertem versus unmodifiziertem Toxin B

Die Abbildung zeigt Übersichtsspektren und daraus abgeleitete Fragmentierungsspektren tryptischer Verdauung von unmodifiziertem (a) im Vergleich zu EPNP-modifiziertem (b) Toxin B. (a) gelb unterlegt ist das Fragment mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) 1010,48, das in der EPNP-modifizierten Präparation (b) das m/z von 1075,49 besitzt (gelb unterlegt). Beide Fragmente wurden ansequenziert. Das Fragmentierungsspektrum ist jeweils in das Übersichtsspektrum eingefügt. Die Peakzuordnung der Fragmentierungsspektren wurde nach der Nomenklatur von Biemann (Biemann 1990) durchgeführt. Die b-Ionen- und y-Ionen-Serie identifizierte die fünf N-terminalen und neun C-terminalen Aminosäuren (fettgedruckt) beider Fragmente. Die Sequenzen stimmen überein; es handelt sich um das Fragment 1652-1678 (QNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQK) des TcdB.

Die Übersichtsspektren beider Toxin B-Präparationen wiesen identische Fragmentmassen auf, mit der Ausnahme eines einzigen Peaks. In der unmodifizierten Toxin B-Probe hatte dieser Peak ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 1010,48 (s. Abb. 33a, gelb unterlegt). In der EPNP-modifizierten Probe (s. Abb. 33b) tritt statt dieses Peaks ein Peak mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 1075,49 (s. Abb. 33b, gelb unterlegt) auf. Beide Peaks treten wechselseitig in den jeweiligen anderen Spektren nicht auf. Da es sich um dreifach geladene Ionen handelt, entsprechen die Masse-zu-Ladungsverhältnisse einem tatsächlichen dreifach höheren Gewicht. Der Peak von 1010,48 entspricht somit einer Masse von 3028,42 Da, der Peak von 1075,49 einem Gewicht von 3223,45 Da. Die Differenz beider Massen beträgt 195 Da, das Gewicht von EPNP.

Um sicherzustellen, dass diese Massendifferenz nicht auf Sequenzunterschiede der Trypsin-Fragmente zurückzuführen ist, wurden beide Peaks isoliert, und der weiteren Fragmentierung unterzogen, um damit ihre Aminosäure-Sequenz zu analysieren. Die b-Ionen Serie (Biemann 1990) zeigte für beide Peaks eine N-terminale Sequenz aus den fünf Aminosäuren QNMIV, die y-Ionen-Serie eine C-terminale Sequenz, bestehen aus den 9 Aminosäuren STVINFSQK. Da die Sequenzen für beide Fragmente identisch waren, handelte es sich um ein und dasselbe Fragment, eines ohne und eines mit der kovalenten EPNP-Modifikation. Da es sich bei den beiden Peaks um das Toxin B-Fragment 1652-1678 handelte, war mit diesen Experimenten das DSG-Motiv an Position 1665 als putatives katalytisches Zentrum der Aspartatprotease bestimmt.

Dieser Versuch zeigt damit eindeutig, dass die Bindung des EPNP an das DSG-Motiv 1665 des TcdB erfolgt, und dass durch EPNP-Bindung die IP6-induzierte Spaltung in die beiden Fragmente von 63 kDa und 207 kDa verhindert wird. Damit war der Beweis erbracht, dass Toxin B selbst die Protease in sich trägt.

4.8 Charakterisierung der Autoproteolyse

Die bis hierher zusammengefassten Ergebnisse hatten gezeigt, dass die Spaltung von Toxin B ein autokatalytischer Prozess ist. Im Weiteren sollte der Prozess der Autoproteolyse nun weiter untersucht werden.

4.8.1 Geschwindigkeit der Autoproteolyse

Zunächst wurde die Geschwindigkeit der autokatalytischen Spaltung von Toxin B untersucht. Im TcdB-Spaltungsassay wurde dazu Toxin B ($5 \mu\text{M}$) mit $100 \mu\text{M}$ Inositolhexaphosphat versetzt, und die Reaktion nach bestimmten Zeiträumen mit Hilfe von Lämmli-puffer gestoppt. Die im SDS-PAGE aufgetrennten Spaltprodukte wurden mit Zinkfärbung angefärbt.

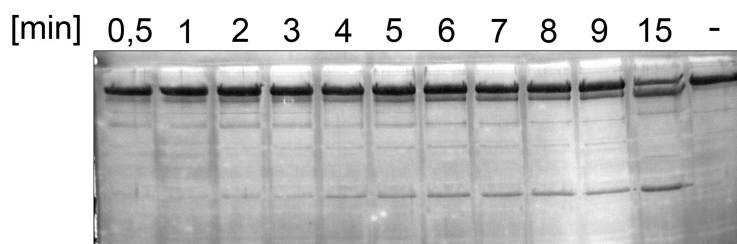


Abbildung 34: Untersuchung der IP6 induzierten TcdB-Spaltung in Abhängigkeit der Zeit

Toxin B ($5 \mu\text{M}$) wurde mit $100 \mu\text{M}$ Inositolhexaphosphat inkubiert. Die Reaktion wurde nach den angegebenen Zeitpunkten (in min) abgestoppt. Das (-) symbolisiert die Negativkontrolle von Toxin B ohne Zugabe von Inositolhexaphosphat.

Bereits nach 30 Sekunden ist eine geringe Menge an Spaltprodukten zu erkennen; die Autokatalyse hat bereits dann in Teilen stattgefunden. Die Menge der Reaktionsprodukte nimmt mit der Zeit stetig zu und erreicht am Ende des Beobachtungszeitraums von 15 min das Maximum, das bisher in Spaltungsassays mit $5 \mu\text{M}$ Toxin B beobachtet wurde.

4.8.2 Untersuchung auf eine Kaskadenreaktion

Es gibt eine Reihe von Reaktionen in der Natur, die als Kaskadenreaktion ablaufen, so dass es zur Steigerung der Effizienz der entsprechenden Prozesse kommt. Ein Beispiel hierfür ist das Komplementsystem (Wecker 1990). Dabei findet eine enzymatische Kaskadenreaktion statt, d.h., die proteolytische Spaltung einer Komplementkomponente führt zur Freisetzung aktiver Proteasen, die wiederum Reaktionen auslösen bis hin zu aktiven Peptiden, die die Mikrozirkulation, die chemotaktische Aktivität von Entzündungszellen und die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren auslösen (Wecker 1990). Ob die TcdB-Spaltprodukte selbst weiterhin proteolytische Aktivität besitzen und andere Toxin B-Moleküle spalten können, dass heißt, ob auch die Spaltung von Toxin B in einer Kaskade abläuft, sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurde unmarkiertes Toxin B mit 100 μ M Inositolhexaphosphat aktiviert und dann beide, das große C-terminale Spaltprodukt (207 kDa) und das kleine N-terminale Spaltprodukt (63 kDa), über Anionenaustausch-Chromatographie isoliert. Das jeweilige Spaltfragment wurde anschließend mit Cy3-markiertem Toxin B (TcdB-Cy3) versetzt, im SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele sowohl im Fluoreszenzimager zur Dokumentation der Cy3-Fluoreszenz fotografiert als auch mit Zink-Färbung die gesamten Proteine sichtbar gemacht. Im Falle einer Kaskadenreaktion sollte das große oder alternativ das kleine Spaltprodukt von Toxin B die Spaltung des Cy3-markierten Toxin B auch ohne Zusatz von IP6 auslösen. Erkennen lassen sich derartige Spaltprodukte in der entsprechenden Fluoreszenzdarstellung (s. Abb.35).

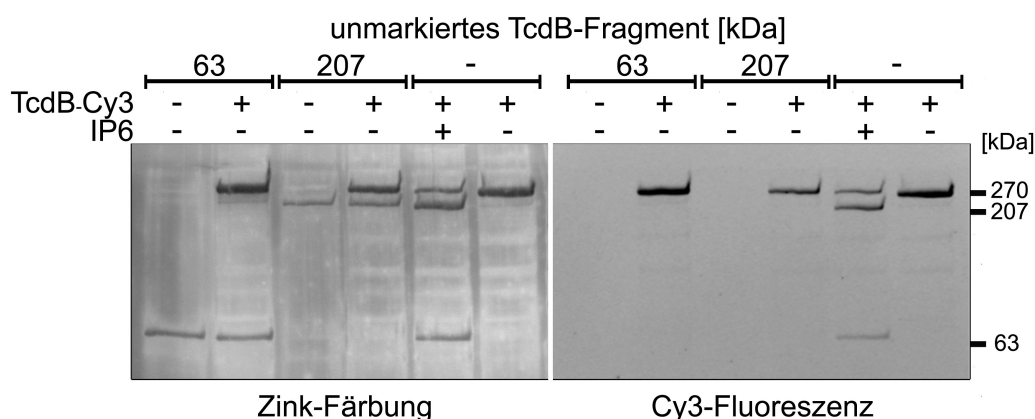


Abbildung 35: Untersuchung der putativen spaltenden Aktivität der TcdB-Spaltprodukte von Toxin B

Cy3-markiertes Toxin B (TcdB-Cy3) wurde mit dem isolierten 63 kDa- bzw. 207 kDa-Spaltprodukt von unmarkiertem Toxin B inkubiert, im SDS-PAGE aufgetrennt und die Spaltprodukte sowohl anhand ihrer Cy3-Fluoreszenz als auch nach Zink-Färbung dargestellt. Das (-) symbolisiert die Abwesenheit, das (+) die

Anwesenheit der jeweiligen angezeigten Substanzen. Als induzierendes Agens wurde Inositolhexaphosphat (IP6) in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt.

Die Fluoreszenzaufnahme in Abbildung 35 zeigt, dass das Cy3-markierte Toxin nur in Anwesenheit von Inositolhexaphosphat (IP6) gespalten wird. Die Spaltung des Cy3-markierten Toxins wird weder durch das 63 kDa- noch durch das 207 kDa-Fragment induziert, obwohl diese Fragmente bereits Kontakt mit Inositolhexaphosphat hatten. TcdB wird demnach nicht in einer Kaskadenreaktion gespalten. Toxin B verliert bereits nach der ersten Aktivierung mit Inositolhexaphosphat und der nachfolgenden autokatalytischen Spaltung jegliche intrinsische Protease-Aktivität.

4.9 Bedeutung der Autokatalyse für den Intoxikationsprozess

Es galt nun die Frage zu beantworten, ob die IP6-induzierte, autokatalytische Spaltung von Toxin B auch eine essentielle biologische Funktion in der Zelle ausübt. Anders formuliert: Muss Toxin B durch Inositolphosphate aktiviert werden, um seine Toxizität ausüben zu können?

Wie in der Einleitung bereits erläutert, durchläuft das Toxin in der Zelle eine Prozessierung, die dafür sorgt, dass die katalytische Domäne (das kleine Spaltfragment) von der Transmembran-Ligandendomäne (großes Spaltfragment) getrennt wird. Erst nach diesem proteolytischen Schritt, so der Stand der Untersuchungen vor den Experimenten zur vorliegenden Arbeit (Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005), erreicht die katalytische Domäne das Zytosol. Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, diese These zu untermauern (oder zu widerlegen).

4.9.1 Zytopathische Effekte nach extrazellulärer Applikation

Um die Bedeutung der Autoproteolyse des TcdB im Rahmen des Intoxikationsprozesses zu untersuchen, wurden Versuche mit Toxin B-Präparationen unternommen, deren intrinsische Aspartatprotease blockiert war. Es wurde erwartet, dass in blockiertem TcdB die Spaltung ausbleibt und damit die katalytisch-toxische Domäne nicht mehr ins Zytosol freigesetzt wird. Extrazellulär auf Zellen appliziert, sollte ein derart modifiziertes Toxin B nicht mehr den typischen zytopathischen Effekt auf Zellen auslösen, da die toxische Untereinheit ihre Zielmoleküle, die kleinen GTPasen, nicht mehr erreichen kann.

Die Experimente wurden mit EPNP-modifiziertem Toxin B ausgeführt. Die vorausgegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die Spaltung von EPNP-modifiziertem Toxin vollständig unterbunden ist (s. Abb. 32), die massenspektrometrischen Untersuchungen (s. Abb. 33) hatten die EPNP-Bindung an das Fragment mit dem DSG-Motiv 1665 bewiesen. Für den nachfolgenden Versuch wurden IHKE-Zellen (Immortalized Human Kidney Epithelial Cells) eingesetzt, die besonders gut an Plastikunterlagen adhärieren. Dem Überstand der Zellen wurde entweder Puffer, unmodifiziertes (1 µg/ml) oder EPNP-modifiziertes Toxin (1 µg/ml) zugefügt und die Effekte nach 2, 7 und 24 Stunden unter dem Mikroskop beobachtet.

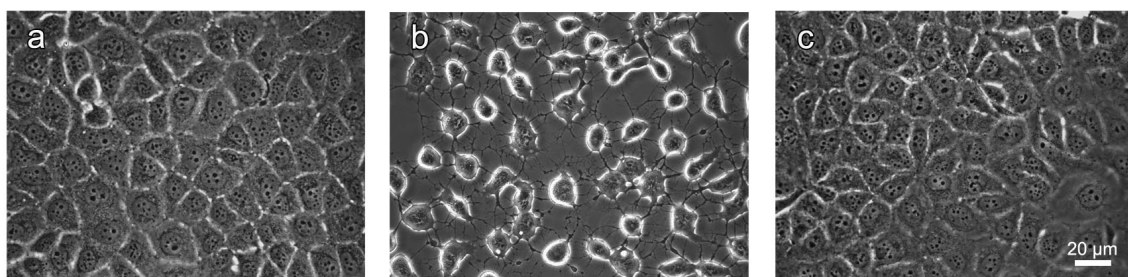


Abbildung 36: Zytopathische Effekte nach extrazellulärer Applikation von EPNP-modifiziertem und unmodifiziertem Toxin B

Zum Überstand von adhärent kultivierten IHKE-Zellen wurde (a) Puffer ohne Toxin, (b) unmodifiziertes Toxin (1 µg/ml) oder (c) EPNP-modifiziertes Toxin (1 µg/ml) zugesetzt. Die Bilder zeigen mikroskopische Bilder der Effekte nach 7 Stunden Inkubation.

Abbildung 36 zeigt, dass IHKE-Zellen sehr gleichmäßig wachsen. Puffer hatte keinen Effekt auf die Zellen, nach Applikation unmodifizierten Toxins (s. Abb. 36b) runden sich die Zellen ab und bilden die für Toxin B des Stammes VPI 10463 typischen Ausläufer, die auf den Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts zurückzuführen sind. Wurde jedoch EPNP-modifiziertes Toxin extrazellulär auf die Zellen appliziert (s. Abb. 36c), so veränderte sich deren Morphologie nicht, sie blieb entsprechend der Pufferkontrolle unverändert. Das Ausbleiben des zytopathischen Effektes machte deutlich, dass die katalytisch-toxische Untereinheit des EPNP-modifizierten Toxins das Zytosol nicht erreicht hat. Die Inhibierung der Spaltung durch EPNP blockiert demzufolge die Prozessierung des Toxins. Die hier aufgeführten Experimente beweisen damit die essentielle biologische Funktion der IP6-induzierten Autoproteolyse bei der TcdB-Intoxikation der Zelle.

4.9.2 Zytopathische Effekte nach intrazellulärer Applikation

Die voranstehenden Experimente hatten gezeigt, dass EPNP-modifiziertes Toxin keinen zytopathischen Effekt auf Zellen ausübt. Um zu beweisen, dass die EPNP-Modifikation des TcdB nicht dessen Glykosyltransferaseaktivität unterbindet, wurden die nachfolgenden Mikroinjektionsversuche mit IHKE-Zellen durchgeführt. Für die Mikroinjektionen wurde entweder Puffer (als Negativkontrolle), unmodifiziertes (1 $\mu\text{g/ml}$; als Positivkontrolle) oder EPNP-modifiziertes Toxin B (1 $\mu\text{g/ml}$) mit FITC-markiertem Dextran versetzt. Das fluoreszenzmarkierte Dextran sollte es ermöglichen, die mikroinjizierten Zellen auch über den Zeitraum von bis zu 24 Stunden zu beobachten.

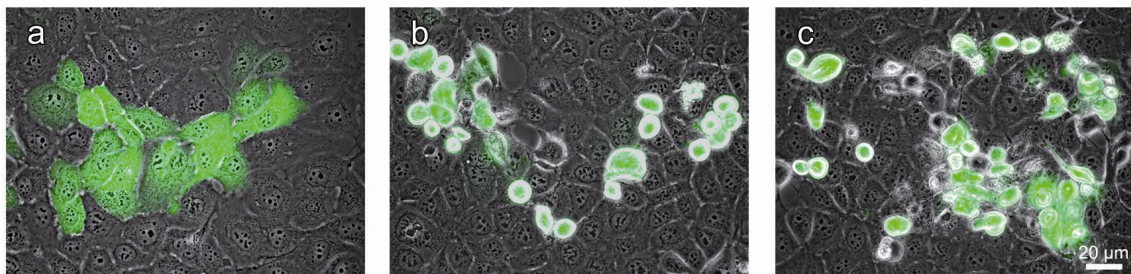


Abbildung 37: Zytopathische Effekte nach intrazellulärer Applikation von EPNP-modifiziertem und unmodifiziertem Toxin B

IHKE-Zellen wurden mit (a) Puffer ohne Toxin, (b) unmodifiziertem Toxin (1 $\mu\text{g/ml}$) und (c) EPNP-modifiziertem Toxin (1 $\mu\text{g/ml}$) mikroinjiziert. Zum Nachweis der Mikroinjektion wurde allen injizierten Proben FITC-markiertes Dextran zugesetzt. Die Aufnahme zeigt mikroskopische Bilder der jeweiligen Effekte auf die Zellen.

Abbildung 37a zeigt, dass IHKE-Zellen keine morphologische Veränderung nach Mikroinjektion des Kontrollpuffers zeigten; die Injektion des Puffers hat offensichtlich keine Auswirkung auf die Zellen. Die Injektion unmodifizierten Toxins zeigte (s. Abb. 37b) den erwarteten zytopathischen Effekt, die Zellen rundeten sich in typischer Weise ab. Im Unterschied zur extrazellulären Applikation (s. Abb. 36) hat die Injektion EPNP-modifizierten Toxins direkt ins Zytosol ebenfalls die TcdB-typischen morphologischen Veränderungen der Zellen zur Folge.

Die Mikroinjektionsversuche beweisen, dass die kovalente Bindung zwischen EPNP und TcdB keine Änderung der Glykosylierungsfähigkeit des EPNP-modifizierten Toxins bewirkt, dass es seine zytopathische Wirkung bei Umgehung des Aufnahmeprozesses ohne Einschränkung ausübt, den toxischen Effekt auf Zellen nach wie vor besitzt.

4.10 Autokatalytische Spaltung anderer LCTs

Die beiden *C. difficile* Toxine A und Toxin B gehören zur Gruppe der großen clostridialen Zytotoxine (Eichel-Streiber et al. 1996). Zur Gruppe der LCTs werden ferner das Letale Toxin von *Clostridium sordellii* (TcsL), das α -Toxin von *Clostridium novyi* (Tcn α) und das Toxin TpeL von *Clostridium perfringens* gerechnet (Amimoto et al. 2007). Auf Grund der großen Ähnlichkeiten der Toxine untereinander galt es zu klären, ob auch die autokatalytische Spaltung unter Induktion mit Inositolphosphaten den anderen Toxinen der LCT-Gruppe gemeinsam ist.

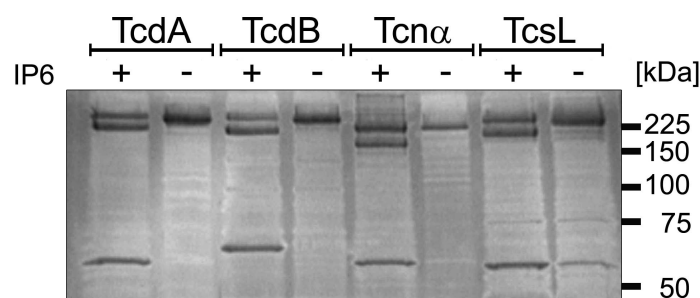


Abbildung 38: Auswirkung von IP6 auf die Spaltung anderer LCTs

Die Abbildung zeigt Spaltungsassay mit (+) oder ohne (-) Aktivierung durch Inositolhexaphosphat (IP6, 10 mM). Verwendet wurden die Toxine TcdA und TcdB von *C. difficile* (Stamm VP110463), Tcn α von *C. novyi* (Stamm 19402) und TcsL von *C. sordellii* (Stamm IP-82). Das Bild zeigt ein 10 % iges-SDS-PAGE-Gel nach Zink-Färbung.

Wie in Abbildung 38 zu sehen, wurden nicht nur die *C. difficile* Toxine A und B (TcdA, TcdB) sondern auch das Letale Toxin und das α -Toxin in einem Inositolhexaphosphat-induzierten, autokatalytischen Prozess gespalten. Die LCTs (nicht getestet TpeL von *C. perfringens*) lassen sich nach IP6-Induktion in ihre A- und B-Untereinheiten spalten. Der Versuch beweist, dass es sich bei der in der vorliegenden Arbeit für das *C. difficile* Toxin B aufgedeckten IP6-induzierten autokatalytischen Spaltung exemplarisch aufgezeigten Aktivierung des TcdB um ein generelles Prinzip der Toxin-Aktivierung der LCTs bei deren Translokation in die Zelle handelt.

5 Diskussion

Das von *C. difficile* produzierte Toxin B gehört zu der Familie der $A_1B_1^{RT}$ -Toxine nach Menetrey et al. 2005. In diesen Toxinen nehmen die A-Untereinheit und die B-Untereinheit unterschiedliche biologische Funktionen wahr. Die A-Untereinheit trägt die katalytisch-toxische Aktivität und die B-Untereinheit ist für den Transport der A-Untereinheit ins Zytosol verantwortlich. Während der Aufnahme in die Zelle durchlaufen AB-Toxine eine Prozessierung, die zur Abtrennung der A- von der B-Untereinheit führt (Falnes & Sandvig 2000). Erst diese Spaltung des Toxins setzt die A-Untereinheit im Zytosol frei, dem Bereich, in dem sie auf ihre Zielmoleküle wirken muss, um die Giftwirkung auszuüben.

Die Spaltung des *C. difficile* Toxin B in seine A- und B-Untereinheit wurde bisher in zwei Veröffentlichungen untersucht (Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005). Die Autoren beider Veröffentlichungen kamen anhand ihrer Experimente zum Schluss, dass eine intrazelluläre Protease der Wirtszelle für die Spaltung des Toxins verantwortlich ist. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, diese Protease zu isolieren und zu identifizieren. Im Laufe der Experimente ergab sich dann ein vollkommen neues Bild des Prozessierungsprozesses, das in der folgenden Diskussion entwickelt wird.

5.1 Paradigmenwechsel – vom Protein zum Inositolphosphat

5.1.1 Ausschluss von Proteinen als Träger der Spaltaktivität der Milzextrakte

Die zentrale Weichenstellung der experimentellen Arbeiten war der Paradigmenwechsel weg von der Aussage der Vorpublikationen, es liege eine intrazelluläre Protease vor, die die Toxine spaltet.

Zu Beginn der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde fest davon ausgegangen, dass es aus Zelllysaten ein Protein zu isolieren galt. Zur Isolierung der gesuchten Protease wurden HPLC-Aufreinigungen durchgeführt. Während dieser Untersuchungen fiel auf, dass die Toxin B-spaltende Aktivität nicht mit proteinchemischen Methoden aufzureinigen war. Effektive Aufreinigungen von Fraktionen, die Toxinspaltung bewirkten, waren mit Anionenaustauschern und Gelfiltrationen durchführbar (s. 4.3). Die effiziente Bindung an Anionenaustauscher deutete auf hydrophile Moleküle hin. Die durch Gelfiltrationen

eingegrenzte Größe der Substanz war sehr überraschend. Die Zielsubstanzen sollten nach der Bestimmung nur 1-5 kDa groß sein, viel zu klein, als dass es sich um eine Protease hätte handeln können. Auffallend war auch die fehlende Absorption bei 280 nm (s. Abb. 11): Proteine weisen auf Grund ihrer aromatischen Aminosäuren normalerweise eine Absorption bei 280 nm auf. Aus Abbildung 11 ist zu ersehen, dass die Fraktionen mit Aktivität im Spaltungsassay keine Absorption bei 280 nm besitzen.

Des Weiteren konnten lediglich sehr schwache Banden im SDS-PAGE aufgereinigter aktiver Fraktionen detektiert werden, die selbst bei Verwendung der sehr sensitiven Deep Purple-Färbung auf Proteine hätten hindeuten können (s. 4.4.1). Trotz fehlender Hinweise auf Proteine waren die angereinigten Fraktionen im Spaltungsassay hoch aktiv.

Nachdem die Hinweise auf Proteine fehlten, wurde versucht, alles Protein aus den Extrakten zu entfernen. Sollten sich danach immer noch spaltaktive Fraktionen isolieren lassen, so wäre der Beweis erbracht, dass die Spaltung durch andere Substanzklassen als Proteine ausgelöst wird. Zur Anreinigung von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Zellextrakten werden häufig Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dabei verbleiben Nukleinsäuren aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen in der oberen wässrigen Phase, während sich die Proteine zwischen beiden Phasen (Wasser/Phenol), in der sog. Interphase, wieder finden. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion der Milzzellaufschlüsse (s. 4.4.2) besaß die wässrige Phase eine gegenüber dem unbehandeltem Milzzellextrakt vergleichbare spaltende Aktivität (s. Abb. 16). Nach mehrfacher Phenolextraktion wird die wässrige Phase proteinfrei, in ihr befinden sich nur noch stark hydrophile Substanzen. Auch das Erhitzen von Milzzellextrakten für 30 min auf 96 °C (s. Abb. 16) und die Behandlung mit Proteinase K hatte keinen Einfluss auf die Spaltung des Toxins (s. Abb. 17). Phenolextraktion und Proteinase-Verdau sind effektive Methoden, um Proteine zu denaturieren/degradieren. Mögliche Proteasen würden in diesen Experimenten in jedem Fall inaktiviert.

Die Schlussfolgerung aus den hier geschilderten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war, dass für die Spaltung von Toxin B keine zelluläre Protease verantwortlich sein kann. Die den beiden Veröffentlichungen (Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005) entnommene Ausgangshypothese traf demnach nicht zu, die spaltende Aktivität konnte keine zytosolische Protease sein.

Auch die stark hydrophilen Nukleotide (s. Tabelle 2) und Nukleinsäuren konnten als in Frage kommende Substanzklassen ausgeschlossen werden. Der Zusatz von Nukleotiden zum Spaltungsassay hatte keine Effekte, und auch die Behandlung der Zellextrakte mit RNase I oder DNase I (s. Abb. 18) verminderte die Spaltwirkung der Milzextrakte auf die Toxine nicht.

5.1.2 Massenspektroskopie zur Eingrenzung der Substanzklasse

Die Eingrenzung der Molekülgröße auf 1-5 kDa hatte es nahe gelegt, massenspektrometrische Analyseverfahren einzusetzen, um Details über die Substanzklasse zu generieren. Die Übersichtsspektren der Fraktionen C4-C6 aus dem letzten Schritt des Aufreinigungsprozesses (s. 4.3) zeigten Hauptpeaks mit Massen von 418,9, 498,9 und 578,8 Da. Dabei fiel auf, dass die Peaks untereinander eine Massedifferenz von 79,97/79,96 Da aufwiesen, ein erster Hinweis auf das Vorliegen von Phosphatgruppen (HPO_3) in den Zielsubstanzen (s. Abb. 20 & 21).

Die Fragmentierung der Hauptpeaks durch Kollision mit Argonatomen, erzeugte Fragmente, die eine Massendifferenz von 79,9 Da zueinander hatten (s. Abb. 21); ein Hinweis dafür, dass die Substanz selbst mehrere Phosphatgruppen enthält. In diesen Versuchen wurden zusätzlich Massendifferenzen von 18 Da detektiert, die Wassermolekülen entsprechen und auf das Vorliegen von Hydroxylgruppen in den Zielsubstanzen deuten (s. Abb. 22).

Die massenspektrometrischen Untersuchungen hatten damit gezeigt, dass die aufgereinigten Fraktionen Substanzen enthalten, die mehrere Phosphat- ($\Delta 80$ Da) und Hydroxylgruppen ($\Delta 18$ Da) besitzen. Offensichtlich handelte es sich nicht um eine einzelne Substanz, sondern um eine Familie von Substanzen, deren Mitglieder sich in der Anzahl von Phosphatgruppen unterscheiden.

5.1.3 Inositolphosphate-IP6

Eine Substanzgruppe, die sowohl Wasser ($\Delta 18$ Da) als auch Phosphate ($\Delta 80$ Da) verlieren kann, keine Extinktion bei 280 nm besitzt, hydrophil ist und bei der es sich nicht um ein Protein handelt, ist die der Inositolphosphate. Inositol ist ein Zucker mit sechs Hydroxylgruppen. Jede davon kann durch eine Phosphatgruppe substituiert werden, so dass sich dreiundsechzig mögliche Isomere ergeben. In der vorliegenden Arbeit wurden Fragmentanalysen von Inositol-1,3,4,5-phosphat vorgenommen. Die Spektren zeigten Fragmentierungsmuster (s. Abb. 24), die völlig identisch mit den Fragmentspektren der aus den Milzzellextrakten aufgereinigten Fraktionen waren (s. Abb. 23).

Um zu beweisen, dass die Toxin-Spaltung tatsächlich durch Inositolphosphate induziert wird, wurden Spaltungsassays Inositolphosphate zugesetzt und gezeigt, dass dadurch die Spaltung von Toxin B induziert wird (s. 4.5). Mit der erfolgreichen Spaltung von TcdB nach Zugabe von

z.B. käuflichem Inositolhexaphosphat war die Natur des zellulären Faktors, der aus den Zellextrakten isoliert worden war, bewiesen.

5.1.4 Vergleichende Untersuchung von IP-Isomeren

Das bekannteste und als erstes entdeckte Inositolphosphat ist das Inositol-1,4,5-phosphat. Es ist ein wichtiges Signalmolekül, das u.a. den intrazellulären Kalzium-Spiegel reguliert (Berridge & Irvine 1989). Wie die Ergebnisse zeigen, ist die Funktion von Inositol-1,4,5-phosphat in der Signaltransduktion der Zelle von der Wirkung im TcdB-Spaltungsassay zu unterscheiden, denn dieses Isomer hat keine TcdB-Spaltung-induzierende Eigenschaft (s. Tab. 3). Die zur Induktion der Spaltung benötigten Konzentrationen von Inositolphosphat variieren zwischen den Isomeren und sind in Tabelle 3 semiquantitativ aufgelistet. Das auch als Phytinsäure bekannte Inositolhexaphosphat induziert die Spaltung bis zu einer Konzentration von 1 μM und ist damit das Isomer mit der höchsten Aktivität (s. Abb. 27). Aus der Tabelle geht auch hervor, dass auch weitere Inositolphosphate neben dem Inositol-1,4,5-phosphat keine Toxin-Spaltung zu induzieren vermögen.

Allen Inositolphosphaten gemeinsam ist ihre negative Ladung. Da unter den isomeren Tetra- und Penta-Inositolphosphaten aber auch einige keinen Effekt im Spaltungsassay besitzen, kann die Induktion der Toxin-Spaltung nicht auf einem reinen Ladungseffekt beruhen.

Beim Vergleich der aktiven vs. inaktiven Isomere unter Einbeziehung struktureller Daten, wie der Lokalisation der Phosphatgruppen in Sessel- und Wannenform, ließen sich keine einfachen Korrelationen ableiten. Erst tieferegehende Röntgenstrukturanalysen von Inositolphosphat-Toxin B-Komplexen werden es erlauben, Regeln für IP-Strukturen abzuleiten, die für die Induktion der Toxinspaltung minimal erforderlich sind.

5.1.5 Charakteristika des aktiven IP6

Inositolhexaphosphat ist in freiem Equilibrium im Zytosol vorhanden (Stuart et al. 1994). Die Zytosolkonzentrationen liegen zwischen 15 und 100 μM (Shears 2001). Die zur Spaltung der Toxine einzusetzenden Konzentrationen an Inositolhexaphosphat (ab 1 μM , s. Abb. 27) bewegen sich damit im physiologischen Bereich.

Neben Inositol-1,4,5-phosphat übt auch Inositolhexaphosphat vielfältige Funktionen in der Zelle aus. So interagiert es beispielsweise mit Proteinen der Sekretion und des vesikulären

Transports (Shears 2001). Eines dieser Proteine ist Synaptotagmin, ein Schlüsselprotein der Kalzium abhängigen Exozytose (Barker & Berggren 1999). Die Bindung von Inositolphosphat an Synaptotagmin ist essentiell für die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran (Mehrotra et al. 2000).

Inositolhexaphosphat besitzt darüber hinaus auch viele gesundheitsförderliche Wirkungen. So ist es beispielsweise in jüngerer Vergangenheit durch seinen positiven Effekt auf einige Krebserkrankungen aufgefallen (Vucenik & Shamsuddin 2006). Auch die Bildung von Nierensteinen kann durch Inositolhexaphosphat-Einnahme inhibiert werden (Grases et al. 1998).

5.2 Die autokatalytische Spaltung

5.2.1 Inositolphosphate besitzen keine Proteaseaktivität

Mit den oben diskutierten Versuchen wurde gezeigt, dass die Spaltung durch Inositolphosphate induziert wird. Welche spezifische Rolle Inositolphosphate in der Spaltungsreaktion haben, war zu diesem Zeitpunkt noch offen; dazu wurden weiterführende Experimente zur Charakterisierung der Spaltungsreaktion durchgeführt.

Basis für alle weiteren Versuche war die Feststellung, dass Inositolphosphate selbst keine katalytische Aktivität besitzen. Von Inositolpyrophosphaten ist bekannt, dass sie Proteine phosphorylieren können, und dass so modifiziert sekundäre Effekte ausgelöst werden (Saiardi et al. 2004). Inositolphosphaten fehlt eine solche hoch energetische Pyrophosphatgruppe, Inositolpyrophosphat-analoge Effekte waren damit auszuschließen.

5.2.2 Mit Pepstatin A auf der Spur zur Aspartatprotease

Ein wichtiger Hinweis auf den Mechanismus der Spaltung war die Inhibierung der IP6-induzierbaren TcdB-Spaltung nach Zugabe von Pepstatin A. Damit bestätigten sich die Ergebnisse von Rupnik et al. (Rupnik et al. 2005), die den Effekt von Pepstatin A auf die Spaltung von Toxin B bereits beschrieben hatten.

Pepstatin A ist ein spezifischer Inhibitor von Aspartatproteasen (Umezawa et al. 1970). Die Unterbindung der IP6 induzierten TcdB-Spaltung nach Zusatz von Pepstatin A initiierte die Suche nach einer Aspartatprotease. Für die Lokalisation der Protease ergaben sich zwei

Möglichkeiten: (i) entweder wurde aus dem Überstand der *C. difficile* Kultur nicht nur Toxin B, sondern auch eine kontaminante Protease aufgereinigt, oder aber (ii) die Protease musste intrinsisch im Toxin B selbst zu finden sein.

5.2.3 Ausschluss TcdB-kontaminierender Proteine

Das Vorliegen einer kontaminierenden Protease in den TcdB-Präparationen ließ sich durch mehrere unabhängige Versuchsansätze ausschließen.

- Alle in den Toxin B-Präparationen vorhandenen zusätzlichen Proteine wurden (i) massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurde kein Protein gefunden, das Homologien zu Endoproteasen hatte (s. 4.6.1).
- Es wurde dann getestet (ii), ob die putative TcdB-kontaminierende Protease Fremdproteine spalten kann. Dabei wurde angenommen, dass eine zufällig mit Toxin B aufgereinigte Protease keine ausschließliche und spezifische Spaltung von Toxin B herbeiführen würde. Keines der drei als Substrat angebotenen unspezifischen Proteine (s. 4.6.3) wurde in Anwesenheit der Toxin B-Präparation und Inositolhexaphosphat gespalten. Die proteolytische Spaltung blieb eine hoch spezifische Reaktion, die auf Toxin B beschränkt ist.
- Um eine solche „hochspezifische Protease“ vom TcdB abzureinigen, wurde (iii) eine weitere Aufreinigung der Toxin B-Präparation durch Affinitätschromatographie unter Nutzung des TcdB-spezifischen monoklonalen Antikörpers 2CV (Sauerborn et al. 1994) vorgenommen. Aber auch diese Nachreinigung änderte an der TcdB-Spaltung nach Zusatz von IP6 nichts (s. 4.6.2). Die Mitreinigung einer kontaminierenden Protease auf den TcdB-spezifischen Antikörper musste an dieser Stelle bereits als sehr unwahrscheinlich angenommen werden.
- Schließlich wurde die Beobachtung genutzt, dass zur IP6-induzierten Spaltung von TcdA eine um den Faktor 1000 erhöhte IP6-Konzentration notwendig ist. Toxin A wird erst ab einer Konzentration von 10 mM Inositolhexaphosphat gespalten, Toxin B-Präparation aber bereits ab einer Konzentration von 10 μ M. Der darauf fußende Versuch 4.6.4 zeigt, dass die Spaltreaktion für das jeweilige Toxin spezifisch ist. Beide Toxine TcdA und TcdB werden spezifisch gespalten. Dieses Faktum würde bedeuten, dass im Fall beider Toxine je eine Toxin A oder B spezifische Inositolphosphat-induzierbare Protease aus *C. difficile* Kulturüberstand mit dem jeweiligen Toxin aufgereinigt worden sein müsste.

Demgegenüber lassen sich die Experimente widerspruchsfrei mit der Annahme interpretieren, dass die TcdA und TcdB Spaltungen nicht durch kontaminierende sondern durch intrinsische Proteasen katalysiert werden.

5.2.4 Die Identifizierung der intrinsischen Protease

Beim Vorliegen von intrinsischen Proteasen musste eine autokatalytische Proteolyse von Toxin B nachweisbar sein. Autokatalytische Reaktionen verlaufen intramolekular, bei einer kontaminierenden Protease würde die Reaktion intermolekular katalysiert. Nach dem Ziegler-Ruggli-Verdünnungsprinzip (Ziegler 1955) werden intramolekulare Reaktionen in Verdünnung bevorzugt, da die Wahrscheinlichkeit, dass Enden oder Teile ein und desselben Moleküls zueinander finden (intramolekulare Reaktion), unabhängig von der Konzentration des Moleküls ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass statt einem zwei Moleküle miteinander reagieren (intermolekulare Reaktion), nimmt demgegenüber mit steigender Verdünnung ab. Aus Abbildung 31 ist zu ersehen, dass der Spaltungsassay mit Toxin B in der Tat in verdünnter Lösung favorisiert wird. Die Hinweise auf eine intrinsische autokatalytische Proteolyse, als Basis für die Prozessierung des TcdB in die Zelle, hatten sich damit verdichtet. Die Protease war entsprechend im Toxin selbst zu suchen.

5.2.5 Kovalente Blockade der Aspartatprotease

Um die Beweiskette zu schließen, wurde nach spezifischen Inhibitoren von Aspartatproteasen gesucht. Unter den Inhibitoren wurde EPNP (1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan) ausgewählt, da diese Substanz dafür bekannt ist, dass sie kovalent an das Aspartat im aktiven Zentrum bindet und so zur Identifikation des aktiven Zentrums genutzt werden kann (Yu et al. 1996). EPNP wurde bereits erfolgreich für Untersuchungen an der HIV-1 Protease eingesetzt (Salto et al. 1994). Dass die EPNP-Modifikation die Toxin B-Prozessierung beeinflusst, wurde vor der weiteren Analyse durch den Nachweis der vollständigen Inhibition der Inositolhexaphosphat-induzierten Spaltung im Spaltungsassay bewiesen (s. Abb. 32). Das aktive Zentrum von Aspartatproteasen enthält das Motiv DSG oder DTG (Rao et al. 1998). Nach EPNP-Modifikation wurde eine Massenerhöhung allein im Fragment 1652-1678 gefunden, so dass das DSG-Motiv an Position 1665 als Teil des aktiven Zentrums der Aspartatprotease im TcdB identifiziert war (s. 4.7).

Die Modifikation mit EPNP bewies gleichzeitig, dass Toxin B sich selbst in einem autoproteolytischen Prozess spaltet.

5.3 Zweite Konformationsänderung und Modell des Ablaufs der Translokation

5.3.1 Inositolphosphat-Interaktion und Auswirkung auf TcdB

Inositolphosphate sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, sie wirken unter anderem als Kofaktoren von Enzymen oder allgemein von Proteinen. Inositolhexaphosphat beispielsweise ist ein essentieller Kofaktor für die korrekte Faltung des Proteins ADAR2, das in die Prozessierung von RNA involviert ist. Ohne Inositolhexaphosphat verliert das Enzym seine Aktivität, da erst Inositolhexaphosphat die korrekte Konformation des Proteins herbeiführt (Macbeth et al. 2005). Auch für die korrekte Konformation des Proteinkomplexes zwischen DNA und Phosphokinasen (DNA-PK), der für die Reparatur von DNA-Doppelsträngen in Säugetierzellen notwendig ist, ist die Bindung von Inositolhexaphosphat essentiell. Mit der Bindung von IP6 ist eine Konformationsänderung verbunden, die die Enzymaktivität deutlich steigert (Byrum et al. 2004). Die Übertragung dieser Vorpublikationen auf die induzierte Autoproteolyse des TcdB führen zur Forderung, dass im TcdB eine IPs-Bindestelle existieren sollte, die eine Konformationsänderung auslöst, welche für den Ablauf der Toxin-Prozessierung essentiell ist.

- Die Suche nach Inositolphosphat-Bindungsstellen in TcdB mit der Motivsuche nach www.expasy.ch deckte eine putative Inositolmonophosphat-Dehydrogenase-Stelle im Bereich der TcdB-Positionen 1517-2142 auf. Das Motiv selber ist in zwei Bereiche unterteilt, einen Bereich von 1517-1593 und einen zweiten von 1918-2142. Der zweite Bereich liegt in der repetitiven Ligandendomäne (1851-2366). Der erste Bereich ist daher wahrscheinlicher in die Bindung von Inositolphosphat involviert.
- Die Translokation des TcdB ist schon allein wegen der notwendigen Überquerung der Zellmembran sicher mit massiven Änderungen der Konformation des Toxins verbunden. Eine erste Konformationsänderung wurde bereits von Henriques & Thelestam im Rahmen der Toxin-Passage der Endosomen gefordert und wird heute fest angenommen (Florin & Thelestam 1986). Aus den Versuchen von Rupnik et al. und Pfeifer et al. (Rupnik et al. 2005, Pfeifer et al. 2003) geht hervor, dass nur die

katalytische Domäne in das Zytosol übertritt. Allein die Abtrennung des katalytischen Fragments vom Rest des Toxins als solchem erfordert zwingend konformationelle Änderungen des Gesamtmoleküls.

Die Identifizierung von zellulären Inositolphosphaten als Auslösern für die intrazelluläre proteolytische Abspaltung in der vorliegenden Arbeit, sowie die vorpublizierten Daten zur IP6-Wirkung auf andere intrazelluläre Proteine (Byrum et al. 2004, Macbeth et al. 2005) führen somit zur Hypothese, dass die Interaktion von IPs mit dem TcdB eine zweite Konformationsänderung des Toxins hervorruft, die die Voraussetzung für die Aktivierung der intrinsischen Protease ist.

5.3.2 TcdB – von der Aufnahme bis zur toxischen Schädigung

Die Aufnahme des Toxin B in die Zelle (s. Abb. 7) lässt sich in mehrere Teilschritte gliedern, die für den Transport der katalytischen Domäne vom Darmlumen ins Zytosol notwendig sind. Für TcdA sind Kohlehydrate als Teil der Rezeptorstrukturen beschrieben worden (Tucker & Wilkins 1991, Karlsson 1995); entsprechende Ergebnisse sind für TcdB noch nicht verfügbar. Dennoch wird, aus Analogie zu den Daten für das homologe Enterotoxin TcdA, auch für TcdB eine rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle gefordert (Lyerly et al. 1988). Die Bedeutung der nachfolgenden Ansäuerung in Endosomen wurde bereits 1986-87 als essentieller Schritt beschrieben (Florin & Thelestam 1986, Henriques et al. 1987). Wie das Toxin im anschließenden Schritt prozessiert und die katalytische Untereinheit im Zytosol freigesetzt wird, war bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit nur partiell geklärt. In den Arbeiten von Rupnik et al. und Pfeifer et al. (Pfeifer et al. 2003, Rupnik et al. 2005) war die Existenz einer zellulären Protease gefordert worden. Pfeifer et al. hatten eine Autoproteolyse ausdrücklich ausgeschlossen.

Die vorliegende Arbeit beweist nun, dass der Prozess durch Inositolphosphate ausgelöst wird und dass TcdB eine intrinsische Proteaseaktivität besitzt. Versetzt man Medium von Zellen mit unmodifiziertem Toxin B, so wird der typische zytopathische Effekt ausgelöst (s. Abb. 36b). Wird TcdB jedoch zuvor mit EPNP modifiziert und extrazellulär appliziert, so bleibt dieser Effekt aus (s. Abb. 36c). Die Zellen sind geschützt, EPNP-modifiziertes Toxin kann die katalytische Domäne nicht mehr ins Zytosol freilassen, denn die induzierte Autoproteolyse wird durch EPNP-Modifikation inhibiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen

ferner, dass Toxin B dennoch seine Glykosyltransferaseaktivität nicht verloren hat (Versuche aus 4.9.2). Die Mikroinjektion von EPNP-modifiziertem Toxin B direkt in das Zytosol der Zelle führt zu morphologischen Veränderungen, wie sie für unmodifiziertes Toxin B charakteristisch sind (s. Abb. 37c). Das Toxin behält seine toxische Aktivität zwar bei, kann aber nach EPNP-Modifikation seine toxische Untereinheit nicht mehr ins Zytosol entlassen und wirkt somit bei Zusatz zu Zellen nicht mehr zytotoxisch.

Das in der Einleitung abgebildete Schema der Prozessierung von Toxin B (s. Abb. 7) kann um die hier zusammengefassten Daten zur induzierten Autoproteolyse ergänzt und damit vervollständigt werden.

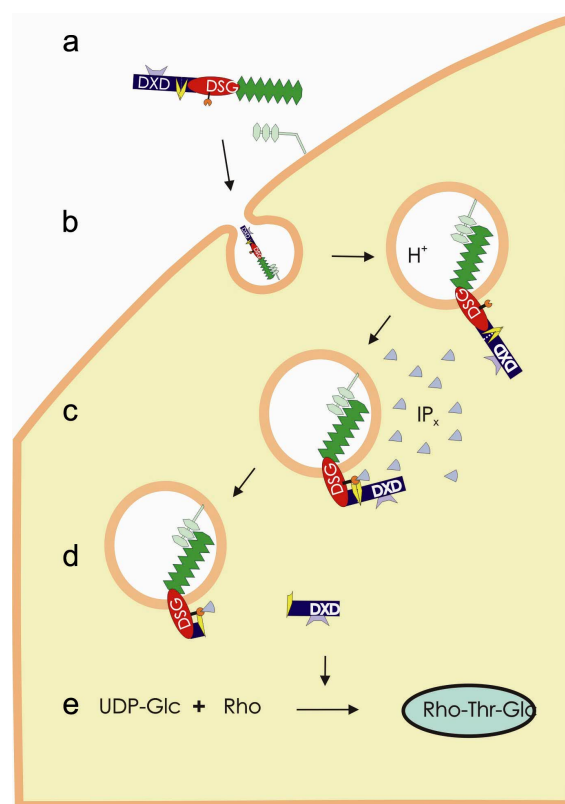


Abbildung 39: Die Prozessierung von Toxin B auf dem neusten Stand

Das Schema stellt in a bis e die Prozesse dar, die für die zelluläre toxische Wirkung des Toxins notwendig sind: a) die Interaktion des Toxins mit dem spezifischen Rezeptor induziert die rezeptorvermittelte-Endozytose; b) die Ansäuerung in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung und Insertion des Toxins in die endosomale Membran mit Ausbildung einer Pore; c) Toxin B interagiert mit Inositolphosphat (IP_x); d) die intrinsische Protease katalysiert die proteolytische Spaltung und setzt das katalytische Fragment ins Zytosol frei; e) Glykosylierung der GTPasen (hier Rho) durch das N-terminale 63 kDa-Fragment und den Kofaktor UDP-Glukose (UDP-Glc) mit Folge der Disaggregation des Zytoskeletts und schließlich Zelltod.

Dem Schema ist zu entnehmen, dass nach der ersten Konformationsänderung des Toxins, ausgelöst durch den niedrigen pH-Wert im Endosom (s. Abb. 39b), die zweite postulierte Konformationsänderung erfolgt. Diese zweite Konformationsänderung wird durch die Bindung von Inositolphosphat induziert und aktiviert die intrinsische Protease des Toxins (s. Abb. 39c).

Die Folge davon ist die unverzügliche Abspaltung der katalytischen Domäne, die damit ins Zytosol freigesetzt ist (s. Abb. 39d). Im Zytosol angelangt, katalysiert die toxisch katalytische Domäne schließlich die bereits 1995 entdeckte Glykosylierung kleiner GTP-bindender Signalproteine der Rho-Subfamilie (s. Abb. 39e). Die dadurch ausgelöste Inaktivierung der Rho-GTPasen löst den Zusammenbruch des Zytoskeletts aus (Just et al. 1995). Die Abspaltung der katalytischen Domäne ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abschließend als unabdingbare Voraussetzung für die Toxinwirkung identifiziert. Der zentrale, bis zuletzt ungelöste Aspekt der Prozessierung des TcdB ins Zytosol ist geklärt, die Erkenntnisse über die molekulare Pathogenese der durch *C. difficile* ausgelösten gastrointestinalen Infektionskrankheiten vervollständigen sich.

5.4 Kritische Würdigung von Vorpublikationen zur Translokation

5.4.1 Zum Einsatz von Inositolphosphaten in Vorpublikationen

Der protektive Effekt von phosphorylierten Substanzen auf die Intoxikation von Zellen mit TcdB war bereits frühzeitig nach der Entdeckung der Toxine in einer Publikation von Florin und Thelestam (Florin & Thelestam 1984) beschrieben worden. In der Arbeit wurden phosphorylierte Substanzen eingesetzt, die eine unterschiedlich ausgeprägte Verzögerung der Zytotoxizität herbeiführten. ATP konnte den zytopathischen Effekt am längsten hinauszögern. In der vorliegenden Arbeit blieben demgegenüber alle Versuche der Induktion der Autoproteolyse von Toxin B unter Einsatz von Nukleotiden erfolglos (s. Tabelle 2). Das bedeutet, dass der von Florin und Thelestam beschriebene protektive Effekt nicht auf die Spaltung des TcdB zurückzuführen sein kann, denn eine vorzeitige extrazelluläre Spaltung ist mit der Blockade der Toxin-Aufnahme verbunden (Rupnik et al. 2005) In derselben Arbeit waren Florin und Thelestam die Ersten und bislang Einzigen die eine protektive Wirkung von Inositolpenta- und -hexaphosphat getestet haben. Sie beschrieben einen leichten Effekt, merkten allerdings an, dass beide Substanzen im Medium ausfielen, so dass sie selbst die Auswertung der Daten für die beiden Inositolphosphate als fraglich bezeichneten (Florin & Thelestam 1984). Unter Einbeziehung der Beobachtung von Rupnik et al. (Rupnik et al. 2005), dass bivalente Ionen die Spaltung blockieren (zurückzuführen auf die Komplexbildung der Inositolphosphate), könnten die von Florin und Thelestam beobachteten Effekte auf bivalente Ionen zurückzuführen sein, denn unlösliche, komplexierte Inositolphosphate können die Toxin-Spaltung nicht induzieren.

Auch der intensivere Einblick in den Ablauf der in der Veröffentlichung durchgeführten Versuche zeigt, dass der protektive Effekt nicht auf die Spaltung des Toxins zurückzuführen sein kann. Florin und Thelestam hatten in ihrer Arbeit Toxin B mit ATP präinkubiert. Die sich daran anschließende Testung der Zytotoxizität auf den Zellen hatte keine Protektion, sondern nur die Verzögerung der zytotoxischen Leistung zur Folge. Diese ATP-Wirkung war nach 24 Stunden zumindest partiell reversibel. Demgegenüber verhindert die IP6-induzierte Spaltung des TcdB die Aufnahme des Toxins in die Zelle. Der IP-Effekt ist, anders als der von ATP, irreversibel.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Prozessierung in die Zelle eng mit der Inositolphosphat-induzierten Abspaltung der katalytisch-toxischen Domäne verbunden. Bei ATP handelt es sich wie bei IPs um ein negativ geladenes Molekül. Setzt man voraus, dass die Ladung der IPs an der Bindung zum Toxin beteiligt ist, so wäre eine Bindung von ATP innerhalb des Bereichs des Toxins, der für die Interaktion mit Inositolphosphat verantwortlich ist, möglich. Solange ATP diese IP-Bindestelle blockiert, wäre der Weg in die Zelle versperrt. Im zeitlichen Verlauf könnte es durch ATP-Verdrängung zur sukzessiven Aufnahme des TcdB in die Zelle kommen. Diese Interpretation könnte auch die von Florin und Thelestam beschriebenen Effekte der getesteten phosphorylierten Substanzen erklären und entspricht deren Vermutungen, dass ATP an das Toxin bindet und dadurch weitere Schritte der Toxinaufnahme in die Zelle inhibiert (Florin & Thelestam 1984).

5.4.2 Zur Autoproteolyse in Vorarbeiten

Die in den beiden Veröffentlichungen zur Spaltung von Toxin B aufgestellte Hypothese, dass eine Wirtszell-Protease Toxin B spaltet (Rupnik et al. 2005, Pfeifer et al. 2003), wird mit den Daten der vorliegenden Arbeit widerlegt.

Beide Veröffentlichungen haben dennoch wesentlich dazu beigetragen, die Faktenlage zu klären. So wurde erkannt, dass ein zytosolischer Faktor die Spaltung auslöst und die Spaltungsreaktion durch Pepstatin A inhibiert werden kann (Rupnik et al. 2005). Bis zur Teilveröffentlichung der Experimente zur vorliegenden Arbeit (Reineke et al. 2007) war kein bakterielles Toxin mit autoproteolytischer Funktion bekannt. Statt dessen kannte man zelluläre Proteasen wie Furin, die die Spaltung einiger bakterieller Toxine katalysieren (Gordon & Leppla 1994). Wegen der fehlenden Hinweise auf eine intrinsische Proteasefunktion wurde

schlussgefolgert, das Toxin B durch eine zytosolische Wirtszell-Protease gespalten wird. Pfeifer et al. schlossen einen autokatalytischen Prozess ausdrücklich aus.

In der vorliegenden Arbeit sind die Experimente zusammengefasst, die zur Entdeckung der IP-induzierten Autoproteolyse der LCTs geführt haben. In diesem Sinn ist Toxin B das erste bakterielle Toxin, für das erkannt wurde, dass es nach Einwirkung zellulärer Wirtsfaktoren durch seine intrinsische autoproteolytische Funktion gespalten wird.

5.5 Induzierte Autoproteolyse bei anderen Toxinen

5.5.1 Large Clostridial Cytotoxins

Toxin B gehört zu der Familie großer clostridialer Toxine (LCTs, s. Einleitung). Die Mitglieder dieser Familie sind das Letale Toxin (TcsL) und das Hämorrhagische Toxin (TcsH) von *C. sordellii*, das α -Toxin (Tcn α) von *C. novyi* und die Toxine A und B (TcdA, TcdB) von *C. difficile*. Die Gruppierung der Toxine in eine separate Toxin-Familie erfolgte anhand der großen Sequenzhomologien der Toxine untereinander, einer ähnlichen Domänen-Struktur und der den Toxinen gemeinsamen Glykosyltransferaseaktivität (Just & Gerhard 2004). Wegen der evolutionären Verwandtschaft der Toxine lag es nahe zu vermuten, dass auch alle anderen Toxine der LCT-Familie diesen Mechanismus der induzierten autokatalytischen Spaltung aufweisen. Spaltungsassays der anderen verfügbaren LCTs unter Gegenwart von Inositolhexaphosphat demonstrieren, dass die Annahme zutrifft, dass es sich um einen generellen Mechanismus der LCTs handelt (s. Abb. 38).

TcdB	YVGNRQ	NMIVE	PNYD	LD	DSG	DISST	VINFS	SQKY	LYGID	SCV	NK
TcdA	YVGNRQ	NMIVE	PNYD	LD	DSG	DISST	VINFS	SQKY	LYGID	SCV	NK
TcsL	YVGNRQ	NLIVE	PSYH	LD	DSG	NISST	VINFS	SQKY	LYGID	RYV	NK
Tcn α	VDFEKC	NVIVS	GSNKL	N	SE	DLAD	TIDV	L	DKD	LEN---	LYIDS

↑

Abbildung 40: Sequenzvergleich der LCTs am Aspartatprotease-Motiv

Sequenzvergleich von Toxin B (TcdB), Toxin A (TcdA), Letalm Toxin (TcsL) und alpha-Toxin (Tcn α) an der Position die dem DSG-Motif 1665 (grau schattiert und mit Pfeil markiert) von Toxin B entspricht. Gelb markiert sind konservierte Aminosäuren.

Wie Abbildung 40 zeigt, besitzen alle LCTs das Aspartatprotease-Motiv DSG an der Position, die dem DSG-Motiv 1665 von Toxin B entspricht.

Allein das α -Toxin von *C. novyi* bildet eine Ausnahme; ihm fehlt das DSG-Motiv an der typischen Position. Die Sequenzhomologie von nur 48 % zu Toxin A und B (Hofmann et al. 1995) zeigt schon, dass Tcn α evolutionär am weitesten von den anderen LCTs entfernt ist. Die geringere Verwandtschaft äußert sich auch im Kofaktor der Glykosylierungsreaktion. Das α -Toxin nutzt N-Acetylglukosamin-Uridin-Diphosphat als Kosubstrat (Selzer et al. 1996). Toxin A und B wie auch das Letale Toxin TcsL nutzen demgegenüber den Kofaktor Glukose-Uridin-Diphosphat (Eichel-Streiber et al. 1996). Es erschien daher zunächst nicht verwunderlich, dass das α -Toxin erneut eine Ausnahme bildet und eine intrinsische Protease einer anderen Proteasefamilie nutzt. Egerer et al. (2007) präsentierten im Anschluss an die Publikation von Teilen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Reineke et al. 2007) dazu weiterführende Experimente (Egerer et al. 2007), die weiter unten ausführlicher diskutiert werden.

5.5.2 Erweiterung auf RTX-Toxine

Nach Veröffentlichung von Teilen der in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse (Reineke et al. 2007) berichteten Sheahan et al. vergleichbare Daten für die Prozessierung des VcRTX-Toxins von *Vibrio cholerae* (Sheahan et al. 2007). Die Autoren fanden ein Cysteinprotease-Motiv in den RTX-Toxinen und demonstrierten eine autoproteolytische Prozessierung des VcRTX-Toxins.

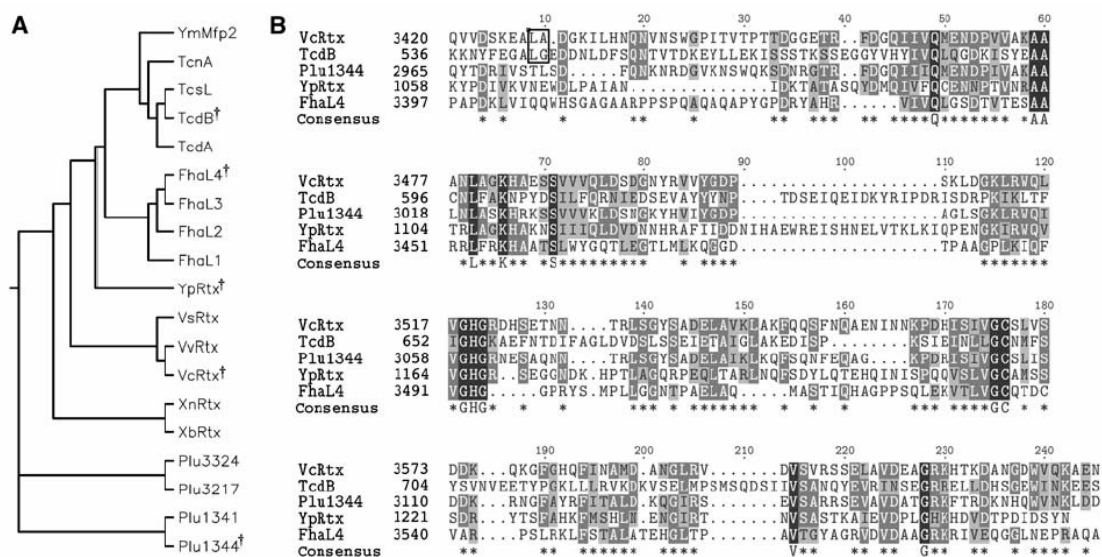


Abbildung 41: Sequenzvergleich von Cysteinprotease-Domänen

Sequenzvergleich von Cysteinprotease-Domänen und deren phylogenetische Verwandtschaft. Verglichen wurden *Vibrio cholerae* (VcRtx), *V. vulnificus* (VvRtx), *V. splendidus* (VsRtx), *Xenorhabdus nematophila* (XnRtx), *X. bovienii* (XbRtx), *C. difficile* Toxin B (TcdB) und Toxin A (TcdA), *C. sordellii* (TcsL), *C. novyi* (TcnA), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpRtx), *Y. mollaretti* (YmMfp2) und *Bordetella pertussis* (FhaL1-4) aus Sheahan et al. 2007.

Die Arbeit von Sheahan et al. fasst eine Reihe von Experimenten zusammen, die zeigen sollen, dass die Spaltung des VcRTX-Toxins durch GTP induziert wird. Das nicht hydrolysierbare GTP γ S (Guanosin-5'-[γ -thiol]triphosphat) zeigte dabei die höchste Aktivität in dem entsprechenden Spaltungsassay des VcRTX-Toxins. Bei GTP γ S handelt es sich um eine künstliche Substanz, die *in vivo* nicht vorkommt. Zudem ist GTP in allen, auch den prokaryotischen Zellen, vorhanden. Folglich müsste das Toxin bereits während seiner Bildung im Bakterium dank der Anwesenheit von GTP gespalten werden. Diese Überlegungen schließen sowohl GTP als auch GTP γ S als Kofaktoren für die *in vivo* induzierte Autoproteolyse eher aus.

Nach Veröffentlichung der autokatalytischen Inositolhexaphosphat-induzierten Spaltung von Toxin B (Reineke et al. 2007) wurde Inositolhexaphosphat auch für die Spaltung des VcRTX-Toxins getestet und zeigte eine volle dem GTP γ S deutlich überlegene Aktivität (Karla Fullner Satchell, mündliche Mitteilung, ETOX 13, San Martino al Cimino, Italien, 2007). Inositolphosphate induzieren somit nicht nur LCTs zur Autoproteolyse, sondern weitere große Toxine, die zu den RTX Toxinen zählen und Cysteinproteasen enthalten.

5.5.3 Cysteinprotease-Aktivität auch in LCTs

Schon in der Arbeit von Sheahan et al. war ein Cysteinprotease-Motiv in den beiden *C. difficile* Toxinen vorhergesagt worden. Eine Untermuerung dieser These wurde erst kürzlich in einer Arbeit von Egerer et al. herbeigeführt (Egerer et al. 2007).

Die TcdB-Proteolyse ließ sich durch N-ethylmaleimide (NEM), einen Cysteinprotease-Inhibitor und Jodoacetamid, eine Substanz, die S-S Brücken blockiert, unterdrücken. Zielgerichtete Mutationen der Cysteinprotease-Motive blockierten die Proteolyse ebenfalls.

Die Reaktion mit NEM wurde im Mainzer Labor mit dem „Mainzer Toxin B“ wiederholt und war ebenso effektiv wie die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Blockade mit EPNP. Beide Substanzen binden kovalent an die TcdB-Sequenz.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit haben zur Hypothese geführt, dass eine zweite Konformationsänderung für die Prozessierung des TcdB essentiell ist. Mit der chemischen Modifikation von Cysteinen wird in Strukturen eingegriffen, die für die dreidimensionale Struktur der Toxine wichtig sind. So könnte es sein, dass die Wirkung der von Egerer et al. eingesetzten Chemikalien vornehmlich auf einen derartigen Eingriff in die Proteinstruktur zustande kommt.

Die Arbeit von Egerer widerspricht den Daten der vorliegenden Arbeit letztlich nur in dem einen Punkt, dass es sich um eine Cysteinprotease und nicht um eine Aspartatprotease handelt, die die induzierte Autoproteolyse der LCTs auslöst. Egerer et al. geben als mögliche Erklärung hierfür das Vorhandensein von zwei intrinsischen Proteasen an, wie dies beispielsweise bei der Carboxypeptidase der Fall ist (Novikova et al. 1999).

Das in der vorliegenden Arbeit entdeckte Prinzip der Inositolphosphat-induzierten Autoproteolyse der LCTs wird durch die Daten von Sheahan und von Egerer nicht nur bestätigt, sondern sogar durch die Ausweitung auf weitere bakterielle Toxine zusätzlich untermauert.

5.6 Vergleich der Prozessierung unterschiedlicher bakterieller Toxine

Die Erkenntnisse zur aktivierenden Prozessierung bakterieller Toxine haben in den letzten Jahren zugenommen. Dennoch bleiben viele Fragen offen; die Proteasen vieler Toxine sind noch gänzlich unbekannt.

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass bakterielle Toxine vom produzierenden Bakterium selbst oder mit Hilfe spezifischer Proteasen der Wirtszelle gespalten werden (Gordon & Leppla 1994).

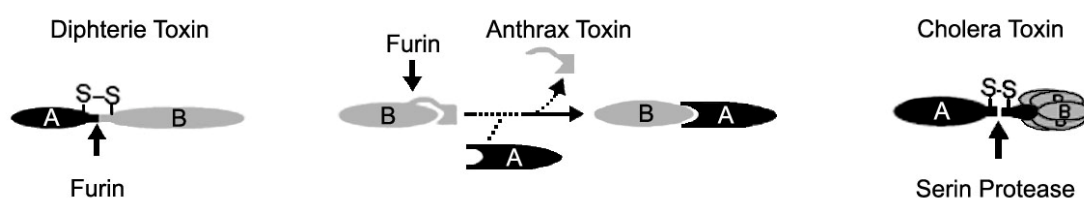


Abbildung 42: Die Spaltung von AB-Toxinen

AB-Toxine unterliegen einer Abspaltung der katalytischen A-Domäne (schwarz) von der/den B-Untereinheit/en (grau). Die Spaltung (schwarzer Pfeil) kann durch Proteasen des Wirtes oder des produzierenden mikrobiellen Erregers erfolgen (z.B. Furin, Serin Protease; s. Text). Häufig verbleiben Disulfid-Brücken (S-S). Im Fall des Anthrax Toxins ist die Abspaltung eines Teils der B-Untereinheit die Voraussetzung dafür, dass die A-Untereinheit an die verkürzte B-Untereinheit zu binden vermag (Falnes & Sandvig 2000).

In eukaryotischen Zellen katalysiert Furin die Spaltung von Proproteinen und Prohormonen und damit deren Aktivierung (van de Ven et al. 1990, Hosaka et al. 1991). Auch eine Reihe von bakteriellen Toxinen nutzt diese ubiquitär vorkommende Protease zur aktivierenden Spaltung.

So ist die Furin-vermittelte Spaltung des Protektiven Antigens von *Bacillus anthracis* essentiell, um die Bindungsstelle für den Ödem Faktor und das Letale Toxin freizulegen. Nach Bindung des Ödem Faktors an den spezifischen Zelloberflächenrezeptor spaltet Furin ein kleines Fragment der B-Untereinheit ab. Erst diese Abspaltung ermöglicht die Bildung eines Komplexes zwischen der verkürzten bindenden B-Untereinheit und der aktiven A-Untereinheit, mit der dann folgenden Endozytose des Komplexes (Mourez 2004).

Auch das Diphtherietoxin unterliegt nach Bindung an den spezifischen Rezeptor der Spaltung durch Furin. Bei DT verbleibt allerdings eine Disulfid-Brücke, die die A-B Fragmente zusammenhält (Watson & Spooner 2006). Wahrscheinlich kommt es erst durch das reduzierende Milieu des Zytosols zur Freisetzung der katalytischen Domäne (Falnes & Olsnes 1995, Falnes & Sandvig 2000).

Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* wird durch Serinproteasen gespalten, die entweder im Lumen des Wirtes vorliegen oder von dem produzierenden Organismus *Vibrio cholerae* ausgeschieden werden (Lencer & Tsai 2003). Auch beim CT bleibt eine Disulfid-Brücke bestehen, bei deren Reduktion die im ER vorkommende eukaryotische Protein-Disulfid-Isomerase beteiligt ist (Orlandi 1997).

Diese Untersuchungen gaben Anlass zur Vermutung, dass nicht nur CT sondern alle über den retrograden Weg transportierten Toxine, deren Untereinheiten über Disulfid-Brücken verbunden sind, über derartige Protein-Disulfid-Isomerase freigesetzt werden (Lord et al. 1999)

Ein Beispiel für bakterieneigene Proteasen ist die von *E. coli* produzierte periplasmatische Protease DegP, von der angenommen wird, dass sie das hitze-labile *E. coli* Enterotoxin während der Passage durch das Periplasma des Bakteriums spaltet. Für die gleiche Aufgabe werden aber auch membranständige Proteasen, wie die Oberflächenprotease OmpT von *E. coli* diskutiert (Strauch et al. 1989).

Die Identität der für die Spaltung von TcdB verantwortlichen Protease war bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Die klassische Protease Furin, die in die Spaltung vieler bakterieller Toxine involviert ist, wurde auch auf die Spaltung von TcdB getestet, war jedoch unwirksam (Rupnik et al. 2005).

Mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit lassen sich die Vorbefunde nun abrunden. Mit der durch intrazelluläre Inositolphosphate ausgelösten Induktion der intrinsischen Proteasefunktion ist die Prozessierung nicht nur von einem Faktor der Zelle (IPs) abhängig, sondern bei der intrinsischen Toxinaktivität handelt es sich in der Tat um eine neu entdeckte Protease. Die wesentlichen Vorhersagen der Arbeit von Rupnik et al. haben sich somit, wenn auch in anderem Kontext, erfüllt.

5.7 Biologische Relevanz

Mit der induzierten, autoproteolytischen Aktivierung der bakteriellen Toxine TcdA und TcdB ist ein neuartiges Prinzip entdeckt worden, nach dem Bakterien sich an den Wirt angepasst haben und ihre Pathogenitätsfaktoren gezielt und effizient einsetzen. Schon kurz nach der Erstbeschreibung (Reineke et al. 2007) konnte es auf andere bakterielle Toxine übertragen werden (Sheahan et al. 2007). Bei dieser Form der Prozessierung bakterieller Pathogenitätsfaktoren handelt es sich offensichtlich um eine äußerst effektive Strategie der Bakterien im Kampf mit ihren Wirten. Schon allein deshalb kann erwartet werden, dass sich das Prinzip der durch intrazelluläre Faktoren induzierten Autoaktivierung auch im Bereich anderer bakterieller (allgemein mikrobieller) Pathogenitätsfaktoren wiederfinden wird.

Jede vorzeitige Aktivierung der für den „angreifenden Erreger“ überlebenswichtigen Pathogenitätsfaktoren außerhalb des Zielbereichs der Pathogenese wirkt sich für den Erreger fatal aus. So haben zum Beispiel Versuche mit den *C. difficile* Toxinen gezeigt, dass die katalytisch toxische A-Untereinheit ohne die B-Untereinheit nicht in die Zelle gelangen kann (Rupnik et al. 2005). Inositolphosphate liegen im Kolon, dem Ort der *C. difficile* Infektion, wegen der Degradation im Verlauf der Magen-Darm-Passage in nur geringen Konzentrationen vor (Schlemmer et al. 2001). Auf dem Weg in die Zelle sind die Endosomen das nächste Kompartiment, in dem eine (vorzeitige) Spaltung erfolgen könnte. Über das Vorkommen von Inositolphosphaten in Endosomen gibt es keine Berichte. Doch allein der niedrige endosomale pH-Wert verhindert die Spaltreaktion im Endosom (Rupnik et al. 2005). Relevante Konzentrationen von Inositolhexaphosphat finden sich erst im Zytosol der eukaryotischen Zelle (Stuart et al. 1994), dem Wirkort der Toxine.

Aus der Sicht von *Clostridium difficile* sind die Toxine somit solange geschützt, bis sie den Ort ihrer Wirkung erreicht haben. Exakt dort sorgt dann die intrinsische Protease für die Freisetzung des schädigenden Bruchstücks, dies alles gesteuert durch den Inositolphosphat-Spiegel im Zellinnern. Inositolphosphate sind damit verteuftelt gute „just in time“-Induktoren der Toxinwirkung.

Die vorliegende Arbeit erweitert das Puzzel der Strategien mikrobieller Pathogenese um ein weiteres sehr interessantes Element. Dies ist der erste Bericht über ein bakterielles Toxin (einen mikrobiellen Pathogenitätsfaktor), das gezielt zelluläre Faktoren der Wirtszelle ausnutzt, um seine Toxizität zu steuern und erst am Wirkort direkt zu entfalten.

Das Bakterium (*C. difficile*) hat während der Evolution diesen äußerst effektiven Weg entwickelt, um den Pathogenitätsfaktor (das Toxin) so lange im inaktiven Zustand zu belassen,

bis dem Pathogenitätsfaktor das „just in time“-Signal (IPs) zur Selbstaktivierung am Wirkort gegeben wird. Im Falle der LCTs (und der RTX-Toxine) wird mit den Inositolphosphaten für die gezielte Aktivierung ein Faktor genutzt, der einen optimalen Schutz der Toxine bis ins Zytoplasma (den Wirkort) hinein gewährleistet. Die Wirkung der Toxine wird so ideal gesteuert.

Zusammen mit der komplexen Regulierung der Toxinproduktion (über die Proteine TcdR & TcdC), Freisetzung (über TcdE) (Braun et al. 1996) und induzierten Selbstaktivierung (Reineke et al. 2007) hat *C. difficile* für seine großen clostridialen Zytotoxine TcdA und TcdB damit eine sehr komplexe Strategie entwickelt, um ein Höchstmaß an Effizienz für Produktion und Entfaltung ihrer Toxizität zu gewährleisten. Der effektive Umgang mit den Toxinen ist mit einer hohen Effizienz in der energetischen und stofflichen Bilanz der Produktion der Toxine von *C. difficile* verbunden. Beides dient direkt der Erhaltung der Art.

Die Frankfurter Allgemeine betitelte einen Kommentar zur Publikation von Reineke et al. (2007) mit „Die Körperfresser kommen“. Dies verdeutlicht schlagworthaft, dass Clostridien als anaerob wachsende Bakterien kommen um zu töten. Beim Kampf mit dem Wirt müssen die Bakterien ihre Waffen gezielt und möglichst effektiv einsetzen. Die Evolution hat zu dem hier zusammengefassten Mosaik an Regel- und Steuermechanismen geführt, die für die Bakterien sehr vorteilhaft sind. Ist der Wirtskörper schlussendlich aufgebraucht, gehen die Bakterien in die Sporenform über, warten auf den nächsten Wirt, um mit diesem dasselbe Spiel von neuem zu beginnen. Der Kreislauf schließt sich.

5.8 Ausblick

5.8.1 Wissenschaftlicher Ausblick

Der Prozess der autokatalytischen Spaltung von Toxin B ist mit der vorliegenden Arbeit und der sie begleitenden Publikation (Reineke et al. 2007) geklärt. Offen bleiben dazu Fragen, wie die Prozessierung im Detail auf Molekülebene abläuft. So wird es der Röntgenstrukturanalyse vorbehalten bleiben, Beweise für die geforderte, Inositolphosphat-induzierte, zweite Konformationsänderung zu liefern. Auch Details über die Bindung von Inositolphosphat könnten auf dieser Methodik generiert werden. Ferner ist bekannt, dass bei der Spaltung von Proteinen durch Aspartatproteasen neben dem Aspartat im katalytischen Zentrum ein weiteres Aspartat beteiligt ist (Coates et al. 2006). Die Identifizierung der Aminosäuren, die an der Katalyse der Spaltung beteiligt sind, wird auch über Röntgenstrukturanalysen verbunden mit NMR-Analysen und Mutationsstudien erfolgen und zusätzliche tiefere Einblicke in die Details des Mechanismus der Proteolyse geben können.

5.8.2 Therapeutischer Ausblick

Die Entdeckung der Inositolphosphat-induzierten autokatalytischen Spaltung eröffnet innovative Therapieansätze zur Behandlung von Antibiotika-assoziiierter Diarrhö und Pseudomembranöser Kolitis.

Abbildung 43 zeigt zwei unterschiedliche Wege, das neue Wissen für die Therapie nutzbar zu machen.

- Die Entwicklung eines Inhibitors der intrinsischen Protease der Toxine, der die Spaltung ähnlich dem EPNP blockiert (s. Abb. 43), könnte eine spezifische Therapie ermöglichen, die direkt am Enzym ansetzt. Beispiele für spezifische Proteaseinhibitoren sind im Fall von HIV (Eder et al. 2007) bereits in die Praxis eingeführt. Die Entwicklung eines vergleichbaren, für die Toxine spezifischen, Inhibitors ist ohne Zweifel eine sehr anspruchsvolle und zeitaufwendige Aufgabe. Erleichternd ist in diesem Zusammenhang die Wirkung im Darmlumen zu bewerten, denn eine Aufnahme des Inhibitors in den Körper ist für die Anwendung zur Blockade der *C. difficile* Toxine nicht notwendig. Dieser Aspekt verringert die Anforderung an Aufnahme und Toxizität der jeweiligen Substanz.

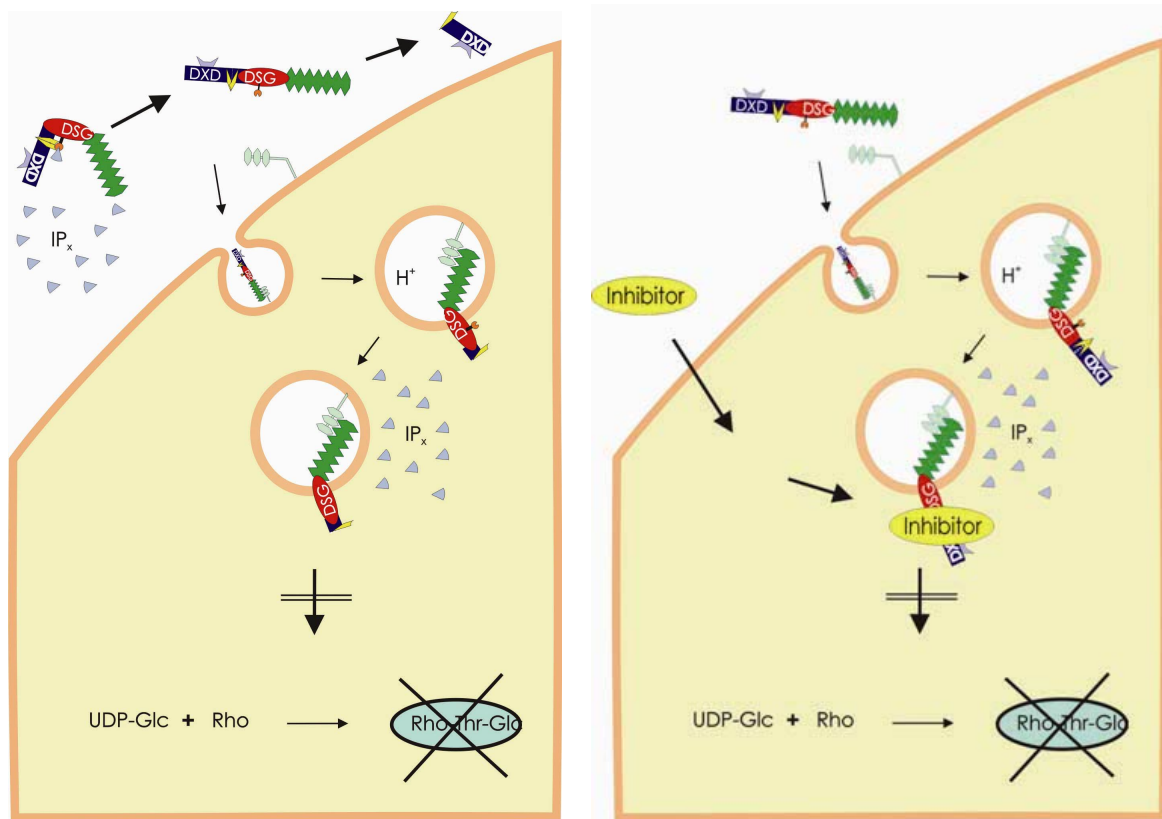


Abbildung 43: Innovative Therapien auf der Basis der neuen Erkenntnisse

Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Antibiotika-assoziierten Diarrhö und Pseudomembranösen Kolitis: (links): exogene Gabe von Inositolhexaphosphat; (rechts): Gabe eines für das Toxin spezifischen Inhibitors, der die intrinsische Protease blockiert

- Weit einfacher erscheint die Verwendung von Inositolhexaphosphat als Therapeutikum. Inositolhexaphosphat (Synonym: Phytinsäure) wird bereits als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt, Es besitzt u.a. einen therapeutischen Effekt bei einigen Krebserkrankungen (Vucenic & Shamsuddin 2006). Bei Entwicklung und Einsatz einer Formulierung, die Inositolhexaphosphat erst im Kolon freisetzt, könnten die Toxine vorzeitig bereits im Kolon und vor Eintritt in die Zelle gespalten werden. Auf diese Weise wären die Zellen geschützt, denn die katalytische A-Domäne alleine, ohne die B-Domäne, kann nicht in die Zelle vordringen.

Für beide Ansätze kann das in vielen Labors etablierte Tiermodell des Hamsters eingesetzt werden (Chang et al. 1978), so dass präklinische Studien sehr schnell umsetzbar würden. Ferner würden beide Therapieformen, im Gegensatz zur bisher angewandten Standard-Therapie mit Antibiotika, keine Dysbiose der Darmflora auslösen, der letztendlich die eigentliche Auslöser für die *C. difficile* Erkrankungen ist. Die wissenschaftlichen Aspekte der vorliegenden Arbeiten werden sich so direkt in praktische Anwendungen überführen lassen.

6 Zusammenfassung

Clostridium difficile, der Auslöser Antibiotika-assoziiierter Durchfälle und deren fataler Form, der Pseudomembranösen Kolitis, ist ein Krankenhauskeim mit weltweit wachsender Bedeutung. Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* sind die beiden „Großen Clostridialen Zytotoxine“ A und B (TcdA, TcdB). Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit publizierte Daten hatten für TcdB gezeigt, dass dessen katalytische Domäne abgespalten werden muss, um die toxische Aktivität im Zytosol zu entfalten. Die Berichte mündeten in der Hypothese, dass für die Spaltung eine zytosolische Protease der Wirtszelle verantwortlich sei. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Protease zu isolieren und zu charakterisieren. Neben der Lymphoblastoid-Zelllinie T2 wurden Primärzellen aus Schweinemilzen als Ausgangsmaterial für HPLC-Aufreinigung der Zielstruktur genutzt. Die Entwicklung komplexer Aufreinigungsschritte führte zu aktiven Fraktionen, deren physiko-chemische Eigenschaften nicht mit denen eines Proteins übereinstimmten. Massenspektrometrische Analysen der spaltung-vermittelnden Fraktionen zeigten Fragmentspektren, die überraschenderweise den von Inositolphosphaten entsprachen. Der Zusatz verschiedenster Inositolphosphate zu der TcdB-Präparation, zeigte schließlich, dass Inositolhexaphosphat in der *in vitro*-Spaltung von Toxin B besonders aktiv ist. Bei dem zytosolischen Faktor handelte es sich demnach, entgegen der Annahmen, um Inositolphosphate. Um den Mechanismus der Inositolphosphat-induzierten Spaltung zu entschlüsseln, wurden kinetische wie auch proteinchemische Versuche durchgeführt. Diese führten zur Interpretation, dass Toxin B einer autokatalytischen Spaltung unterliegt, die von Inositolphosphaten als Kofaktor abhängt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde der Aspartatprotease-Inhibitor 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan (EPNP) eingesetzt, von dem bekannt ist, dass er kovalent an das katalytische Zentrum von Aspartatproteasen bindet. Modifikation von TcdB durch EPNP inhibierte die IP6-induzierte TcdB-Spaltung. Die Massenspektrometrie lokalisierte die kovalente EPNP-Bindung innerhalb des Toxin B im DSG-Motiv der Position 1665. Um zu beweisen, dass die Modifikation des katalytischen Zentrums die TcdB-Wirkung verhindert, wurden Zellintoxikationen unter Toxinzusatz zum Medium oder nach Mikroinjektion ins Zytosol der Testzelle durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Blockade der Spaltungsfähigkeit die Freisetzung der toxischen Domäne verhindert und damit deren zytotoxische Effekte inhibiert wird. Nach Mikroinjektion bleibt die Toxinwirkung erwartungsgemäß erhalten. Die vorliegende Arbeit beschreibt damit das Prinzip der induzierten autoproteolytischen Aktivierung eines bakteriellen Toxins. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass nicht nur TcdB, sondern alle „Großen Clostridialen Zytotoxine“ nach diesem Prinzip prozessiert werden. Kurz nach Publikation der Primärdaten der vorliegenden Arbeit (Reineke et al. 2007) wurde die IP6-induzierte Autoproteolyse auch für *Vibrio cholerae* RTX-Toxin bestätigt, so dass das neu entdeckte Prinzip größere Allgemeingültigkeit hat.

7 Literaturverzeichnis

- Alfa, M. J.; Du, T., and Beda, G. Survey of incidence of *Clostridium difficile* infection in Canadian hospitals and diagnostic approaches. *J. Clin. Microbiol.* **1998**. 36(7): 2076-2080
- Amimoto, K.; Noro, T.; Oishi, E., and Shimizu, M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology.* **2007**. 153(Pt 4): 1198-1206
- Barker, C. J. and Berggren, P.O. Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus-secretion coupling. *Anticancer Res.* **1999**. 19(5A): 3737-3741
- Barth, H.; Pfeifer, G.; Hofmann, F.; Maier, E.; Benz, R., and Aktories, K. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* **2001**. 276(14): 10670-10676
- Bartlett, J. G. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N. Engl. J Med.* **2002**. 346(5): 334-339
- Bartlett, J. G.; Onderdonk, A.B.; Cisneros, R.L., and Kasper, D.L. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect. Dis.* **1977**. 136(5): 701-705
- Berridge, M. J. and Irvine, R.F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* **1989**. 341(6239): 197-205
- Biemann, K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* **1990**. 193886-887
- Braun, V.; Hundsberger, T.; Leukel, P.; Sauerborn, M., and Eichel-Streiber, C. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene.* **1996**. 181(1-2): 29-38
- Brazier, J. S. and Borriello, S.P. Microbiology, epidemiology and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2000**. 2501-33
- Busch, C.; Hofmann, F.; Gerhard, R., and Aktories, K. Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxin glycosyltransferases. *J Biol. Chem.* **2000**. 275(18): 13228-13234
- Busch, C.; Hofmann, F.; Selzer, J.; Munro, S.; Jeckel, D., and Aktories, K. A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J Biol. Chem.* **1998**. 273(31): 19566-19572
- Byrum, J.; Jordan, S.; Safrany, S.T., and Rodgers, W. Visualization of inositol phosphate-dependent mobility of Ku: depletion of the DNA-PK cofactor InsP6 inhibits Ku mobility. *Nucleic Acids Res.* **2004**. 32(9): 2776-2784

- Castagliuolo, I.; Riegler, M.F.; Valenick, L.; LaMont, J.T., and Pothoulakis, C. Saccharomyces boulardii protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* **1999**. 67(1): 302-307
- Chang, T. W.; Bartlett, J.G.; Gorbach, S.L., and Onderdonk, A.B. Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect. Immun.* **1978**. 20(2): 526-529
- Chaudhary, V. K.; Jinno, Y.; FitzGerald, D., and Pastan, I. Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**. 87(1): 308-312
- Chenal, A.; Nizard, P., and Gillet, D. Structure and function of diphtheria toxin: from pathology to engineering. *J toxicol.* **2002**. 21(4): 321-358
- Coates, L.; Erskine, P.T.; Mall, S.; Gill, R.; Wood, S.P.; Myles, D.A., and Cooper, J.B. X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases. *Eur. Biophys. J.* **2006**. 35(7): 559-566
- Collier, R. J. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* **1975**. 39(1): 54-85
- Eder, J.; Hommel, U.; Cumin, F.; Martoglio, B., and Gerhartz, B. Aspartic proteases in drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2007**. 13(3): 271-285
- Egerer, M.; Giesemann, T.; Jank, T.; Satchell, K.J., and Aktories, K. Auto-catalytic cleavage of Clostridium difficile toxins A and B depends on a cysteine protease activity. *J Biol. Chem.* **2007**.
- Eichel-Streiber, C.; Boquet, P.; Sauerborn, M., and Thelestam, M. Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol.* **1996**. 4(10): 375-382
- Eichel-Streiber, C.; Laufenberg-Feldmann, R.; Sartingen, S.; Schulze, J., and Sauerborn, M. Comparative sequence analysis of the Clostridium difficile toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* **1992**. 233(1-2): 260-268
- Eichel-Streiber, C.; Warfolomeow, I.; Knautz, D.; Sauerborn, M., and Hadding, U. Morphological changes in adherent cells induced by Clostridium difficile toxins. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**. 19(4): 1154-1160
- Falnes, P. O. and Olsnes, S. Cell-mediated reduction and incomplete membrane translocation of diphtheria toxin mutants with internal disulfides in the A fragment. *J Biol. Chem.* **1995**. 270(35): 20787-20793
- Falnes, P. O. and Sandvig, K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**. 12(4): 407-413
- Fekety, R.; McFarland, L.V.; Surawicz, C.M.; Greenberg, R.N.; Elmer, G.W., and Mulligan, M.E. Recurrent Clostridium difficile diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin. Infect. Dis.* **1997**. 24(3): 324-333

- Fernandez-Patron, C.; Hardy,E.; Sosa,A.; Seoane,J., and Castellanos,L. Double staining of coomassie blue-stained polyacrylamide gels by imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining: sensitive detection of coomassie blue-undetected proteins. *Anal. Biochem.* **1995**. 224(1): 263-269
- Finney, J. M. T. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1893**. 453-
- Florin, I. and Thelestam,M. Internalization of Clostridium difficile cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1983**. 763(4): 383-392
- Florin, I. and Thelestam,M. Polyphosphate-mediated protection from cellular intoxication with Clostridium difficile toxin B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1984**. 805(2): 131-136
- Florin, I. and Thelestam,M. Lysosomal involvement in cellular intoxication with Clostridium difficile toxin B. *Microb. Pathog.* **1986**. 1(4): 373-385
- Freeman, J. and Wilcox,M.H. Antibiotics and Clostridium difficile. *Microbes. Infect.* **1999**. 1(5): 377-384
- Frey, S. M. and Wilkins,T.D. Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on Clostridium difficile toxin A. *Infect. Immun.* **1992**. 60(6): 2488-2492
- Frisch, C.; Gerhard,R.; Aktories,K.; Hofmann,F., and Just,I. The complete receptor-binding domain of Clostridium difficile toxin A is required for endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**. 300(3): 706-711
- Geny, B. and Popoff,M.R. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol. Cell.* **2006**. 98(11): 667-678
- George, R. H.; Symonds,J.M.; Dimock,F.; Brown,J.D.; Arabi,Y.; Shinagawa,N.; Keighley,M.R.; Alexander-Williams,J., and Burdon,D.W. Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.* **1978**. 1(6114): 695-
- Gill, D. Seven toxic peptides that cross cell membranes. *Bacterial Toxins and Cell Membranes, Academic Press.* **1978**. 291-332
- Gorbach, S. L. Antibiotics and Clostridium difficile. *N. Engl. J. Med.* **1999**. 341(22): 1690-1691
- Gordon, V. M. and Leppla,S.H. Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infect. Immun.* **1994**. 62(2): 333-340
- Grases, F.; Garcia-Gonzalez,R.; Torres,J.J., and Llobera,A. Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand. J Urol. Nephrol.* **1998**. 32(4): 261-265
- Hafiz, S. and Oakley,C.L. Clostridium difficile: isolation and characteristics. *J. Med. Microbiol.* **1976**. 9(2): 129-136
- Hall, A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science.* **1990**. 249(4969): 635-640

- Hall, I. C. and O'Tool,E. Intestinal flora in new born infants. *Am. J. Dis. Child.* **1935**. 31(1): 390-402
- Hatheway, C. L. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* **1990**. 3(1): 66-98
- Hazes, B. and Read,R.J. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry.* **1997**. 36(37): 11051-11054
- Henriques, B.; Florin,I., and Thelestam,M. Cellular internalisation of Clostridium difficile toxin A. *Microb. Pathog.* **1987**. 2(6): 455-463
- Hofmann, F.; Busch,C.; Prepens,U.; Just,I., and Aktories,K. Localization of the glucosyltransferase activity of Clostridium difficile toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J. Biol. Chem.* **1997**. 272(17): 11074-11078
- Hofmann, F.; Herrmann,A.; Habermann,E., and Eichel-Streiber,C. Sequencing and analysis of the gene encoding the alpha-toxin of Clostridium novyi proves its homology to toxins A and B of Clostridium difficile. *Mol. Gen. Genet.* **1995**. 247(6): 670-679
- Hosaka, M.; Nagahama,M.; Kim,W.S.; Watanabe,T.; Hatsuzawa,K.; Ikemizu,J.; Murakami,K., and Nakayama,K. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol. Chem.* **1991**. 266(19): 12127-12130
- Hsu, F. F.; Turk,J., and Gross,M.L. Structural distinction among inositol phosphate isomers using high-energy and low-energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *J. Mass Spectrom.* **2003**. 38(4): 447-457
- Hull, M. W. and Beck,P.L. Clostridium difficile-associated colitis. *Can. Fam. Physician.* **2004**. 501536-5
- Jackson, M. E.; Simpson,J.C.; Girod,A.; Pepperkok,R.; Roberts,L.M., and Lord,J.M. The KDEL retrieval system is exploited by Pseudomonas exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **1999**. 112 (Pt 4)467-475
- Jones, R. L. Diagnostic procedures for isolation and characterization of Clostridium difficile associated with enterocolitis in foals. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1989**. 1(1): 84-86
- Just, I. and Gerhard,R. Large clostridial cytotoxins. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **2004**. 15223-47
- Just, I.; Selzer,J.; Wilm,M.; Eichel-Streiber,C.; Mann,M., and Aktories,K. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature.* **1995**. 375(6531): 500-503
- Karlsson, K. A. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**. 5(5): 622-635
- Kobel, T. and Marti,M.C. [100 years later. The discovery of the tetanus bacillus (1884)]. *Rev. Med. Suisse Romande.* **1985**. 105(6): 547-556

- Koopmann, J. O.; Albring, J.; Huter, E.; Bulbuc, N.; Spee, P.; Neefjes, J.; Hammerling, G. J., and Momburg, F. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*. **2000**. 13(1): 117-127
- Kuijper, E. J.; Coignard, B., and Tull, P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**. 12 Suppl 62-18
- Kushnaryov, V. M. and Sedmak, J. J. Effect of *Clostridium difficile* enterotoxin A on ultrastructure of Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **1989**. 57(12): 3914-3921
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**. 227(5259): 680-685
- Larson, H. E.; Parry, J. V.; Price, A. B.; Davies, D. R.; Dolby, J., and Tyrrell, D. A. Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.* **1977**. 1(6071): 1246-1248
- Larson, H. E.; Price, A. B.; Honour, P., and Borriello, S. P. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*. **1978**. 1(8073): 1063-1066
- Lencer, W. I.; Constable, C.; Moe, S.; Jobling, M. G.; Webb, H. M.; Ruston, S.; Madara, J. L.; Hirst, T. R., and Holmes, R. K. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol.* **1995**. 131(4): 951-962
- Lencer, W. I. and Tsai, B. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem. Sci.* **2003**. 28(12): 639-645
- Loo, V. G.; Poirier, L.; Miller, M. A.; Oughton, M.; Libman, M. D.; Michaud, S.; Bourgault, A. M.; Nguyen, T.; Frenette, C.; Kelly, M.; Vibien, A.; Brassard, P.; Fenn, S.; Dewar, K.; Hudson, T. J.; Horn, R.; Rene, P.; Monczak, Y., and Dascal, A. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N. Engl. J. Med.* **2005**. 353(23): 2442-2449
- Lord, J. M.; Smith, D. C., and Roberts, L. M. Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells. *Cell Microbiol.* **1999**. 1(2): 85-91
- Lyerly, D. M.; Krivan, H. C., and Wilkins, T. D. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**. 1(1): 1-18
- Macbeth, M. R.; Schubert, H. L.; Vandemark, A. P.; Lingam, A. T.; Hill, C. P., and Bass, B. L. Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*. **2005**. 309(5740): 1534-1539
- McDonald, L. C.; Killgore, G. E.; Thompson, A.; Owens, R. C., Jr.; Kazakova, S. V.; Sambol, S. P.; Johnson, S., and Gerding, D. N. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **2005**. 353(23): 2433-2441
- McFarland, L. V.; Surawicz, C. M.; Greenberg, R. N.; Fekety, R.; Elmer, G. W.; Moyer, K. A.; Melcher, S. A.; Bowen, K. E.; Cox, J. L.; Noorani, Z.. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA*. **1994**. 271(24): 1913-1918

- McFarland, L. V.; Surawicz, C.M.; Rubin, M.; Fekety, R.; Elmer, G.W., and Greenberg, R.N. Recurrent *Clostridium difficile* disease: epidemiology and clinical characteristics. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **1999**. 20(1): 43-50
- Mehrotra, B.; Myszka, D.G., and Prestwich, G.D. Binding kinetics and ligand specificity for the interactions of the C2B domain of synaptogmin II with inositol polyphosphates and phosphoinositides. *Biochemistry.* **2000**. 39(32): 9679-9686
- Menetrey, J.; Gillet, D., and Menez, A. Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon.* **2005**. 45(2): 129-137
- Miesenbock, G. and Rothman, J.E. The capacity to retrieve escaped ER proteins extends to the trans-most cisterna of the Golgi stack. *J Cell Biol.* **1995**. 129(2): 309-319
- Molloy, S. S.; Bresnahan, P.A.; Leppla, S.H.; Klimpel, K.R., and Thomas, G. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol. Chem.* **1992**. 267(23): 16396-16402
- Mourez, M. Anthrax toxins. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **2004**. 152:135-164
- Munro, S. and Pelham, H.R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* **1987**. 48(5): 899-907
- Mylonakis, E.; Ryan, E.T., and Calderwood, S.B. *Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review. *Arch. Intern. Med.* **2001**. 161(4): 525-533
- Novikova, E. G.; Eng, F.J.; Yan, L.; Qian, Y., and Fricker, L.D. Characterization of the enzymatic properties of the first and second domains of metallo-carboxypeptidase D. *J Biol. Chem.* **1999**. 274(41): 28887-28892
- Oh, K. J.; Senzel, L.; Collier, R.J., and Finkelstein, A. Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**. 96(15): 8467-8470
- Orlandi, P. A. Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of the A subunit of cholera toxin in a human intestinal cell line. *J Biol. Chem.* **1997**. 272(7): 4591-4599
- Orlandi, P. A. and Fishman, P.H. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* **1998**. 141(4): 905-915
- Pfeifer, G.; Schirmer, J.; Leemhuis, J.; Busch, C.; Meyer, D.K.; Aktories, K., and Barth, H. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **2003**. 278(45): 44535-44541
- Plempner, R. K.; Bohmler, S.; Bordallo, J.; Sommer, T., and Wolf, D.H. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* **1997**. 388(6645): 891-895
- Poutanen, S. M. and Simor, A.E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ.* **2004**. 171(1): 51-58

- Qa'Dan, M.; Spyres, L.M., and Ballard, J.D. pH-induced conformational changes in Clostridium difficile toxin B. *Infect. Immun.* **2000**. 68(5): 2470-2474
- Rao, M. B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**. 62(3): 597-635
- Reineke, J.; Tenzer, S.; Rupnik, M.; Koschinski, A.; Hasselmayer, O.; Schrattenholz, A.; Schild, H., and Eichel-Streiber, C. Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B. *Nature*. **2007**. 446(7134): 415-419
- Riedel, B. M. Über Darmdiphtherie nach schweren Operationen bei sehr geschwächten Kranken. *Dtsch. Ztschr. Chir.* **1902**. 67402-412
- Rifkin, G. D.; Fekety, R., and Silva, J.R. Neutralization by Clostridium sordellii antitoxin of Toxins implicated in Clindamycin-induced cecitis in the Hamster. *Gastroenterology*. **1978a**. 75(3): 422-424
- Rifkin, G. D.; Silva, J., Jr., and Fekety, R. Gastrointestinal and systemic toxicity of fecal extracts from hamsters with clindamycin-induced colitis. *Gastroenterology*. **1978b**. 74(1): 52-57
- Riley, T. V. Clostridium difficile: a pathogen of the nineties. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**. 17(3): 137-141
- Rittinger, K.; Walker, P.A.; Eccleston, J.F.; Nurmahomed, K.; Owen, D.; Laue, E.; Gamblin, S.J., and Smerdon, S.J. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*. **1997a**. 388(6643): 693-697
- Rittinger, K.; Walker, P.A.; Eccleston, J.F.; Smerdon, S.J., and Gamblin, S.J. Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*. **1997b**. 389(6652): 758-762
- Rupnik, M.; Pabst, S.; Rupnik, M.; Eichel-Streiber, C.; Urlaub, H., and Soling, H.D. Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of Clostridium difficile toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology*. **2005**. 151(Pt 1): 199-208
- Saiardi, A.; Bhandari, R.; Resnick, A.C.; Snowman, A.M., and Snyder, S.H. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*. **2004**. 306(5704): 2101-2105
- Salter, R. D. and Cresswell, P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J.* **1986**. 5(5): 943-949
- Salto, R.; Babe, L.M.; Li, J.; Rose, J.R.; Yu, Z.; Burlingame, A.; De Voss, J.J.; Sui, Z.; Ortiz, d.M., and Craik, C.S. In vitro characterization of nonpeptide irreversible inhibitors of HIV proteases. *J Biol. Chem.* **1994**. 269(14): 10691-10698
- Sandvig, K. and van Deurs, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev.* **1996**. 76(4): 949-966

- Sandvig, K. and van Deurs, B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther.* **2005**. 12(11): 865-872
- Sauerborn, M.; Hegenbarth, S.; Laufenberg-Feldmann, R.; Leukel, P., and von Eichel-Streiber, C. Monoclonal Antibodies discriminating between Clostridium difficile Toxins A and B. **1994**. Suppl 24510-511
- Sauerborn, M.; Leukel, P., and Eichel-Streiber, C. The C-terminal ligand-binding domain of Clostridium difficile toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**. 155(1): 45-54
- Schirmer, J. and Aktories, K. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**. 1673(1-2): 66-74
- Schlemmer, U.; Jany, K.D.; Berk, A.; Schulz, E., and Rechkemmer, G. Degradation of phytate in the gut of pigs--pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch. Tierernahr.* **2001**. 55(4): 255-280
- Schmitz, A.; Herrgen, H.; Winkeler, A., and Herzog, V. Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol.* **2000**. 148(6): 1203-1212
- Sebahia, M.; Wren, B.W.; Mullany, P.; Fairweather, N.F.; Minton, N.; Stabler, R.; Thomson, N.R.; Roberts, A.P.; Cerdeno-Tarraga, A.M.; Wang, H.; Holden, M.T.; Wright, A.; Churcher, C.; Quail, M.A.; Baker, S.; Bason, N.; Brooks, K.; Chillingworth, T.; Cronin, A.; Davis, P.; Dowd, L.; Fraser, A.; Feltwell, T.; Hance, Z.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Price, C.; Rabbinowitsch, E.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Stevens, K.; Unwin, L.; Whithead, S.; Dupuy, B.; Dougan, G.; Barrell, B., and Parkhill, J. The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Genet.* **2006**. 38(7): 779-786
- Sehr, P.; Joseph, G.; Genth, H.; Just, I.; Pick, E., and Aktories, K. Glucosylation and ADP-ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry.* **1998**. 37(15): 5296-5304
- Selzer, J.; Hofmann, F.; Rex, G.; Wilm, M.; Mann, M.; Just, I., and Aktories, K. Clostridium novyi alpha-toxin-catalyzed incorporation of GlcNAc into Rho subfamily proteins. *J Biol. Chem.* **1996**. 271(41): 25173-25177
- Sheahan, K. L.; Cordero, C.L., and Satchell, K.J. Autoprocessing of the Vibrio cholerae RTX toxin by the cysteine protease domain. *EMBO J.* **2007**. 26(10): 2552-2561
- Shears, S. B. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal.* **2001**. 13(3): 151-158
- Silverman, J. A.; Mindell, J.A.; Zhan, H.; Finkelstein, A., and Collier, R.J. Structure-function relationships in diphtheria toxin channels: I. Determining a minimal channel-forming domain. *J Membr. Biol.* **1994**. 137(1): 17-28
- Simpson, J. C.; Smith, D.C.; Roberts, L.M., and Lord, J.M. Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp. Cell Res.* **1998**. 239(2): 293-300

- Songer, J. G. and Anderson, M.A. Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*. **2006**. 12(1): 1-4
- Spyres, L. M.; Daniel, J.; Hensley, A.; Qa'Dan, M.; Ortiz-Leduc, W., and Ballard, J.D. Mutational analysis of the enzymatic domain of Clostridium difficile toxin B reveals novel inhibitors of the wild-type toxin. *Infect. Immun.* **2003**. 71(6): 3294-3301
- Spyres, L. M.; Qa'Dan, M.; Meader, A.; Tomasek, J.J.; Howard, E.W., and Ballard, J.D. Cytosolic delivery and characterization of the TcdB glucosylating domain by using a heterologous protein fusion. *Infect. Immun.* **2001**. 69(1): 599-601
- Strauch, K. L.; Johnson, K., and Beckwith, J. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of Escherichia coli at high temperature. *J Bacteriol.* **1989**. 171(5): 2689-2696
- Stuart, J. A.; Anderson, K.L.; French, P.J.; Kirk, C.J., and Michell, R.H. The intracellular distribution of inositol polyphosphates in HL60 promyeloid cells. *Biochem. J.* **1994**. 303 (Pt 2) 517-525
- Takai, Y.; Sasaki, T., and Matozaki, T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **2001**. 81(1): 153-208
- Taylor, N. S.; Thorne, G.M., and Bartlett, J.G. Comparison of two toxins produced by Clostridium difficile. *Infect. Immun.* **1981**. 34(3): 1036-1043
- Tedesco, F. J.; Barton, R.W., and Alpers, D.H. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann. Intern. Med.* **1974**. 81(4): 429-433
- Toma, S.; Lesiak, G.; Magus, M.; Lo, H.L., and Delmee, M. Serotyping of Clostridium difficile. *J. Clin. Microbiol.* **1988**. 26(3): 426-428
- Tucker, K. D. and Wilkins, T.D. Toxin A of Clostridium difficile binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* **1991**. 59(1): 73-78
- Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M., and Hamada, M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J Antibiot. (Tokyo)*. **1970**. 23(5): 259-262
- van de Ven, W. J.; Voorberg, J.; Fontijn, R.; Pannekoek, H.; van den Ouweland, A.M.; van Duijnhoven, H.L.; Roebroek, A.J., and Siezen, R.J. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **1990**. 14(4): 265-275
- Vucenik, I. and Shamsuddin, A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr. Cancer.* **2006**. 55(2): 109-125
- Wagenknecht-Wiesner, A.; Weidmann, M.; Braun, V.; Leukel, P.; Moos, M., and Eichel-Streiber, C. Delineation of the catalytic domain of Clostridium difficile toxin B-10463 to an enzymatically active N-terminal 467 amino acid fragment. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**. 152(1): 109-116
- Watson, P. and Spooner, R.A. Toxin entry and trafficking in mammalian cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**. 58(15): 1581-1596
- Wecker, E. Immunologie kurzgefasst. *BI-Wissenschaftlicher-Verlag, Mannheim.* **1990**.

- Welch, D. F. and Marks, M.I. Is *Clostridium difficile* pathogenic in infants? *J. Pediatr.* **1982**. 100(3): 393-395
- Wiertz, E. J.; Tortorella, D.; Bogoy, M.; Yu, J.; Mothes, W.; Jones, T.R.; Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*. **1996**. 384(6608): 432-438
- Yu, Z.; Caldera, P.; McPhee, F.; De Voss, J.J.; Jones, P.R.; Burlingame, A.; Kuntz, I.D.; Craik, C.S., and Ortiz, d.M. Irreversible Inhibition of the HIV-1 Protease: Targeting Alkylating Agents to the Catalytic Aspartate Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**. 1185846-5856
- Zahar, J. R. and Ferroni, A. [Infections caused by multiresistant bacteria]. *Rev. Prat.* **2006**. 56(13): 1397-1404
- Zhan, H.; Choe, S.; Huynh, P.D.; Finkelstein, A.; Eisenberg, D., and Collier, R.J. Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry*. **1994**. 33(37): 11254-11263
- Zhang, R. G.; Scott, D.L.; Westbrook, M.L.; Nance, S.; Spangler, B.D.; Shipley, G.G., and Westbrook, E.M. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J Mol. Biol.* **1995**. 251(4): 563-573
- Ziegler, K. *Methoden der Organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart (Hrsg. : E. Müller). **1955**. Bd.4/2