

**Aus dem Institut für Toxikologie der  
Medizinischen Hochschule Hannover**

**Charakterisierung von mutiertem *Clostridium difficile* Toxin A  
zur Bestimmung von Glucosyltransferase-abhängigen Effekten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

**vorgelegt von Matthias Teichert**

**aus Bremen**

**Hannover 2007**

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 02.03.2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident/in: Professor Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: PD Dr. Ralf Gerhard

Referentin: Prof. Dr. med. Christian Strassburg

Koreferentin: PD Dr. med. Susanne Haeussler

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

Promotionsausschussglieder: Prof. Dr. Hans-Heinrich Kreipe

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

Prof. Dr. Reinhard Brunkhorst

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Publikation.....</b>	<b>1-5</b>
<b>2. Zusammenfassung.....</b>	<b>6-11</b>
2.1. Einleitung.....	6-9
2.2. Zielsetzung.....	9
2.3. Ergebnisse und Diskussion.....	9-10
2.4. Literatur.....	11
Lebenslauf.....	12-13
Danksagung.....	14
Eidesstattliche Erklärung.....	15

## Application of Mutated *Clostridium difficile* Toxin A for Determination of Glucosyltransferase-Dependent Effects

Matthias Teichert, Helma Tatge, Janett Schoentaube, Ingo Just, and Ralf Gerhard\*

Institute of Toxicology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany

Received 4 April 2006/Returned for modification 15 May 2006/Accepted 16 July 2006

**Mutation of tryptophan-101 in *Clostridium difficile* toxin A, a 308-kDa glucosyltransferase, resulted in a 50-fold-reduced cytopathic activity in cell culture experiments. The mutant toxin A was characterized and applied to distinguish between glucosyltransferase-dependent and -independent effects with respect to RhoB up-regulation as a cellular stress response.**

*Clostridium difficile* toxins A and B (TcdA and TcdB, respectively) are the major pathogenicity factors that are causative for antibiotic-associated pseudomembranous colitis (19). Several reports of the in vivo effects of TcdA in

animal models reflect efforts to understand the cellular mechanism leading to clinical symptoms as well as to the release of mediators that are involved in the inflammatory process (2, 13, 15, 18, 20). The inherent glucosyltransferase

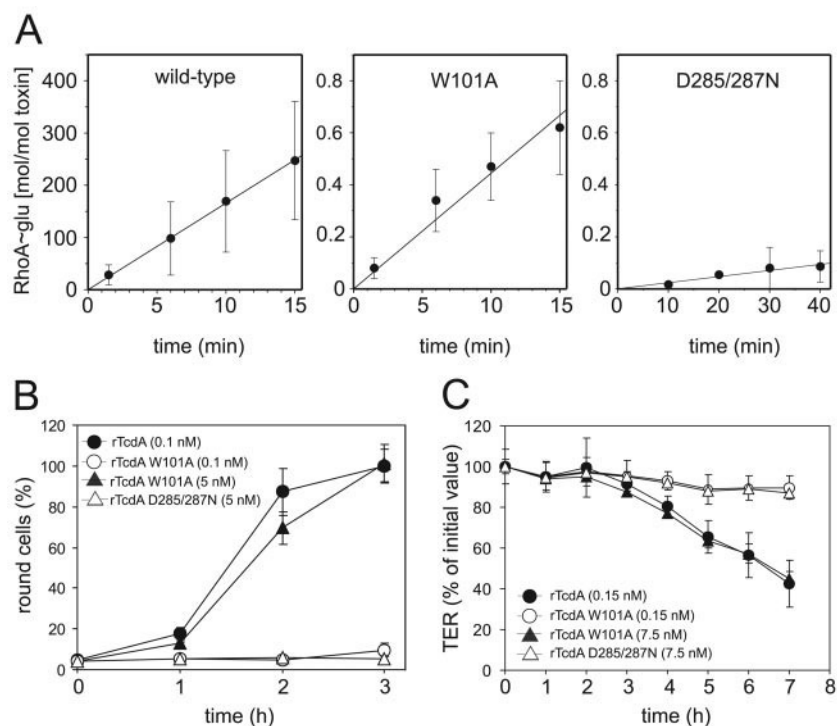


FIG. 1. (A) In vitro glucosyltransferase activities of wild-type and mutant rTcdA with the substrate RhoA. Enzyme activities were calculated for rTcdA (16.6 mol/mol · min), rTcdA W101A (0.044 mol/mol · min), and rTcdA D285/287N ( $2.4 \times 10^{-3}$  mol/mol · min) (data are means  $\pm$  standard deviations [SD];  $n = 4$  [for rTcdA D285/287N,  $n = 3$ ]). (B) The kinetics of cell rounding by 0.1 nM wild-type rTcdA (●) and 5 nM rTcdA W101A (▲) were identical, whereas 0.1 nM rTcdA W101A (○) and rTcdA D285/287N (△) did not cause rounding of cells within a period of 3 h (data are means  $\pm$  SD;  $n = 5$ ). (C) The integrity of Caco-2 cell monolayers was checked by measuring the TER after treatment with the indicated toxins applied to the apical site for 7 h. Only cells treated with 0.15 nM wild-type rTcdA (●) or 7.5 nM rTcdA W101A (▲) showed significant decreases in the TER, whereas cells treated with 0.15 nM rTcdA W101A (○) or 7.5 nM rTcdA D285/287N (△) were not affected (data are means  $\pm$  SD;  $n = 3$ ).

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany. Phone: 49 511 532 2810. Fax: 49 511 532 2879. E-mail: gerhard.ralf@mh-hannover.de.

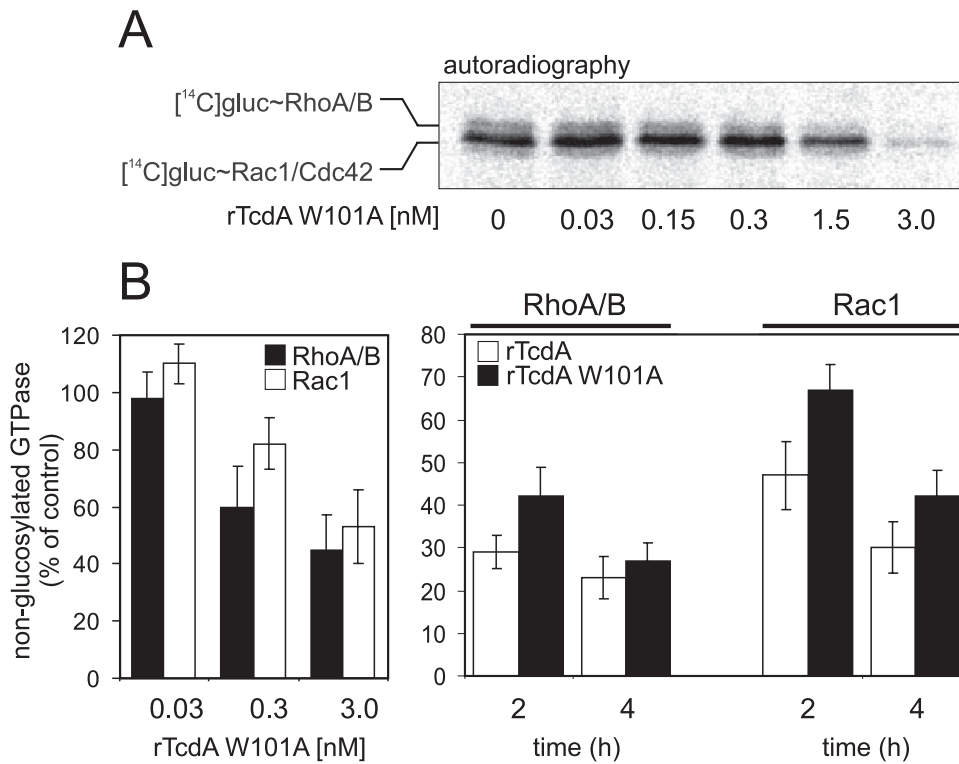


FIG. 2. (A) Sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation of lysates from toxin-treated Caco-2 cells. Reduced signals in the autoradiograph indicate the previous glucosylation of Rho GTPases by incubation with the indicated concentrations of rTcdA W101A for 16 h. (B) Specific rTcdA W101-catalyzed glucosylation of Rho and Rac from Swiss 3T3 fibroblasts was estimated by detection of unmodified GTPases. (Left) Concentration-dependent glucosylation of RhoA/B (black bars) and Rac1 (white bars) by rTcdA W101A. (Right) Time-dependent glucosylation of RhoA/B and Rac1 by rTcdA (white bars) and rTcdA W101A (black bars). Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

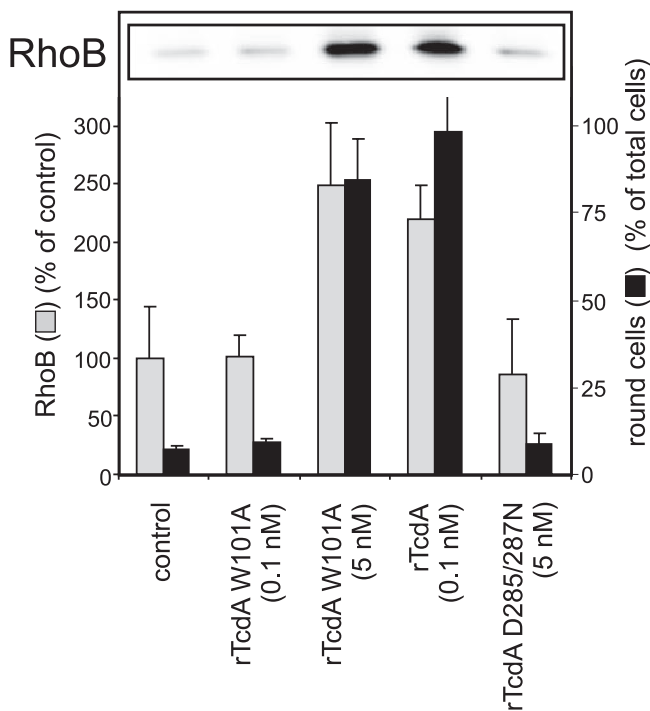


FIG. 3. Up-regulation of RhoB is a sequel of Rho glucosylation. Western blot analysis showed the amounts of RhoB in toxin-treated cells (inset). The bar chart shows the correlation of toxin-induced cell rounding and RhoB expression (data are means  $\pm$  SD;  $n = 4$ ).

(GT) activity of TcdA/B, which catalyzes monoglucosylation of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42, is well described (11, 12). However, Rho inactivation is not in accordance with the activation of Rho-dependent proinflammatory signal cascades (14). To address the issue of GT-independent effects, we used recombinant TcdA (rTcdA) (4, 10) and generated two mutant toxins by site-directed mutagenesis of the expression vector. Two highly conserved motifs were chosen for mutation, namely, tryptophan-101 and the DXD motif at positions 285 to 287 (3, 17). Analogous mutations of TcdB resulted in reductions of the *in vitro* GT activity, by factors of 1,000 and 5,000, respectively (5, 6, 16). The *in vitro* GT activities of rTcdA (wild type), rTcdA W101A (tryptophan mutant), and rTcdA D285/287N (DXD mutant) were determined from the linear phases of RhoA glucosylation kinetics (Fig. 1A), as described elsewhere (7). The GT activities of the W101A and D285/287N mutants were reduced 380-fold and 6,900-fold, respectively, compared to that of wild-type rTcdA. In contrast to the case in the cell-free system, the cytopathic activity of rTcdA W101A on Swiss 3T3 fibroblasts was estimated to be reduced only 50-fold (Fig. 1B). In addition, the colonic cell line Caco-2 was used to investigate the cytopathic property of mutant toxins with respect to transepithelial electrical resistance (TER). The TER of confluent Caco-2 cell monolayers grown on filter inserts (Falcon; BD, Germany) was determined, starting with an initial value of at least  $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Fig. 1C).

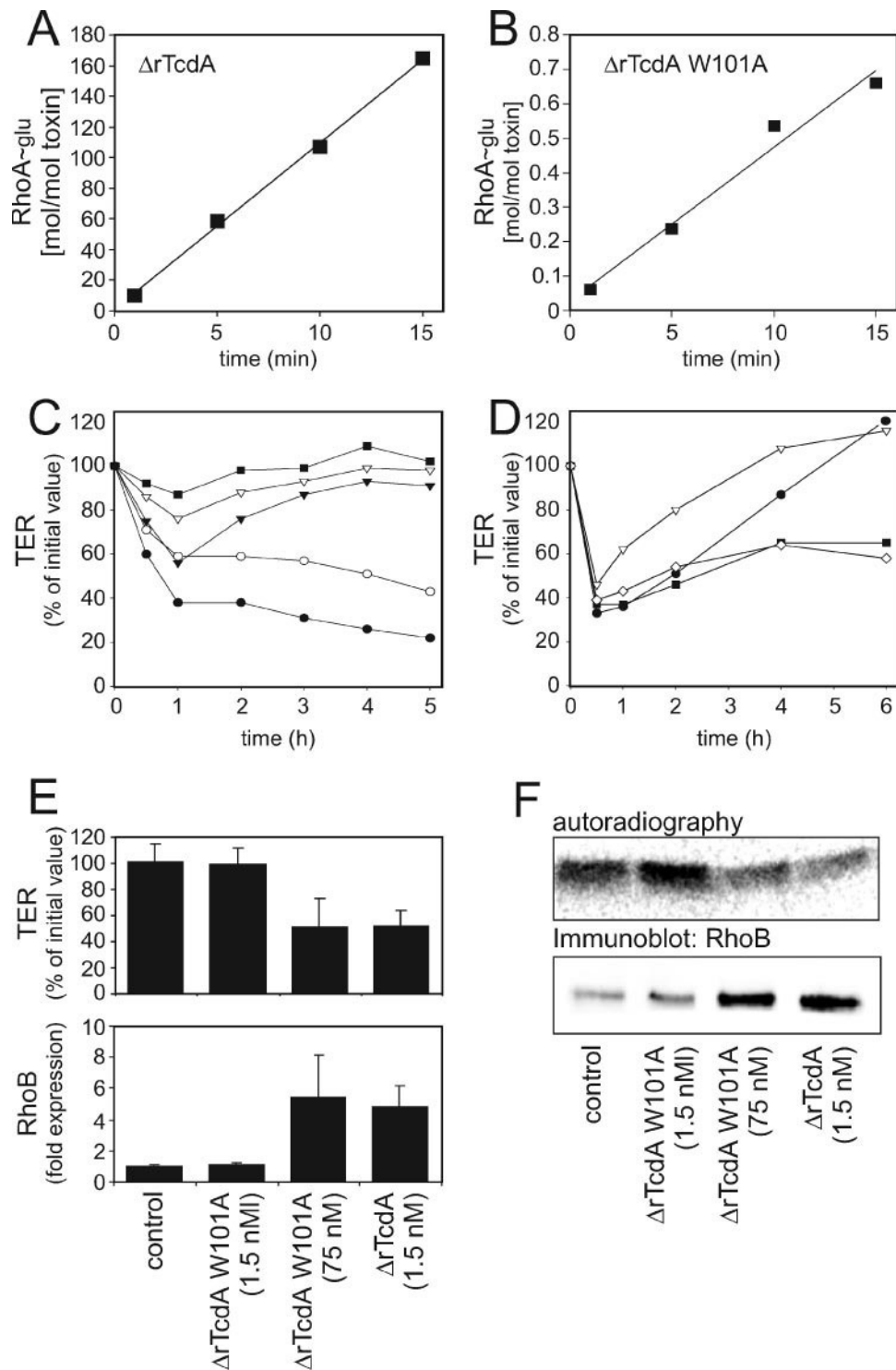


FIG. 4. Electroporation of Caco-2 cell monolayers. (A and B) In vitro glucosyltransferase activities of  $\Delta rTcdA$  (10.3 mol/mol  $\cdot$  min) and  $\Delta rTcdA$  W101A (0.04 mol/mol  $\cdot$  min). (C) Determination of minimal effective concentrations of  $\Delta rTcdA$ . ■, 0.006 nM; ▽, 0.06 nM; ▼, 0.6 nM; ○, 1.5 nM; ●, 3 nM. (D) Alteration of TER by 50  $\mu$ l bone morphogenetic protein fraction (●) or 1.5 nM  $\Delta rTcdA$  W101A (▽),  $\Delta rTcdA$  W101A (75 nM, ■), or wild-type  $\Delta rTcdA$  (◇). (E) Statistical evaluation of the TER measured after 6 h of treatment with the indicated toxins (top panel). (Bottom) Densitometric evaluation of RhoB immunoblots. The data shown are mean values for three separate experiments  $\pm$  standard deviations. (F) (Top) Sequential  $^{14}$ C-glucosylation of cell lysates from electroporated Caco-2 cells. (Bottom) RhoB up-regulation in electroporated Caco-2 cells. The set of experiments shown is representative of three separate experiments.

rTcdA W101A (7.5 nM) caused identical alteration of the TER ( $45\% \pm 4\%$  of the initial value after 7 h) to that caused by 0.15 nM wild-type rTcdA ( $43\% \pm 11\%$ ). rTcdA W101A at an equimolar concentration (0.15 nM;  $90\% \pm 6\%$ ) and rTcdA D285/287N (7.5 nM) did not significantly affect the TER ( $87\% \pm 3\%$  of the initial value after 7 h).

To check the extent of intracellular glucosylation of GTPases, unmodified GTPases were detected by either sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation (RhoA/B and Rac1) (12), [ $^{32}\text{P}$ ]ADP ribosylation (RhoA/B) (1), or Western blot analysis (with anti-Rac1, which exclusively recognizes unmodified Rac1) (8). There was a concentration-dependent decrease in sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation (Fig. 2A) that was obvious in cells incubated with 1.5 nM or higher concentrations of rTcdA W101A. Figure 2B shows the concentration- and time-dependent glucosylation of RhoA/B and Rac1 by rTcdA W101A. The amounts of nonglucosylated RhoA/B and Rac1 in 3T3 fibroblasts treated for 2 or 4 h with different concentrations of rTcdA W101A were almost identical in the respective cell lysates (Fig. 2B, left panel). The glucosylation kinetics of RhoA/B and Rac1 by rTcdA W101A (5 nM) did not differ significantly from those by rTcdA (0.1 nM) (Fig. 2B, right panel).

To check whether the previously reported up-regulation of the immediate-early gene product RhoB (9) is dependent on the GT activity of TcdA, enzyme activity-deficient rTcdA and rTcdA with reduced enzyme activity were applied. rTcdA (0.1 nM) induced strong synthesis of the RhoB protein in Swiss 3T3 fibroblasts after 4 h (Fig. 3, inset). Enzyme activity-deficient rTcdA D285/287N had no effect on RhoB up-regulation, even at a concentration of 100 nM, whereas the tryptophan mutant toxin (rTcdA W101A) showed a concentration-dependent effect. Thus, significant RhoB up-regulation was detected only with those concentrations of tryptophan mutant toxin that were sufficient to cause cytopathic effects. The concentration-dependent up-regulation of RhoB in correlation with cell rounding was determined in quadruplicate, and the results are displayed in Fig. 3.

The N-terminal fragment of TcdA encompasses amino acids 1 to 1065 ( $\Delta\text{rTcdA}$ ) and consists of the minimal catalytic domain (amino acids 1 to 542) plus the portion up to the putative transmembrane region. However,  $\Delta\text{rTcdA}$  lacks the transmembrane and receptor binding domains and is therefore incapable of entering target cells. The specific GT activities of  $\Delta\text{rTcdA}$  and  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A were 10.3 mol/mol · min and 0.04 mol/mol · min, respectively (Fig. 4A and B) and thus did not differ significantly from the GT activities of the corresponding holotoxins. To deliver the N-terminal fragments into intact cells by circumventing the active process of endocytosis, the electroporation technique (3  $\mu\text{F}$ , 500 V) was applied (5). The minimal concentration of  $\Delta\text{rTcdA}$  that induced an irreversible decrease in the TER over a period of 5 h was determined (Fig. 4C). A time course of TER measurements for Caco-2 cell monolayers was performed with  $\Delta\text{rTcdA}$ ,  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A, and 50  $\mu\text{l}$  *Bacillus megaterium* protein fraction as a negative control for protein impurities (Fig. 4D). Mean values after 6 h of treatment for three separate experiments are shown in Fig. 4E. To complete the study of the intracellular effects of  $\Delta\text{rTcdA}$  and  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A, sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation of the cell

lysates of electroporated monolayers was performed (Fig. 4F, upper panel). Compared to controls, there was no decrease in sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation of lysates from cells treated with 1.5 nM  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A, but there was a reduction of about 40% in lysates from cells treated with either 75 nM  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A or 1.5 nM  $\Delta\text{rTcdA}$ . In accordance with the effects on the TER and sequential  $^{14}\text{C}$ -glucosylation, up-regulation of RhoB was induced only by 1.5 nM  $\Delta\text{rTcdA}$  and 75 nM  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A, as shown by Western blot analysis (Fig. 4F, lower panel).  $\Delta\text{rTcdA}$  W101A (1.5 nM) did not induce the up-regulation of RhoB. A densitometric analysis of three separate experiments is shown in Fig. 4E, lower panel.

In summary, this study evaluated tryptophan-101 mutant toxin A (rTcdA W101A) as a tool for studying glucosyltransferase-independent effects of *C. difficile* toxins because of its step-like concentration dependency on intact cells. rTcdA W101A has the same properties as wild-type rTcdA when applied at a 50-fold higher concentration than that of wild-type toxin to intact cells. At an equimolar concentration, the mutant toxin is inactive towards intact cells. In contrast to the enzyme activity-deficient DXD mutant, the remainder enzyme and cytopathic activity of the tryptophan mutant prove that it has correct toxic competence. The difference in GT activities in a cell-free system and in intact cells was shown to be due to intracellular conditions but not to uptake-mediated refolding of toxins.

This study was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 621 (project B5).

We thank Christiane Hotopp-Herrgesell for excellent technical assistance in cell culture and Markus Isermann for providing RhoA. We are also grateful to Karsten Heidrich, Institute of Physiological Chemistry, for sequencing the constructs.

#### REFERENCES

- Ahnert-Hilger, G., M. Hölting, G. Grosse, G. Pickert, C. Mücke, B. Nixdorf-Bergweiler, P. Boquet, F. Hofmann, and I. Just. 2004. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **90**:9–18.
- Anton, P. M., J. Gay, A. Mykoniatis, A. Pan, M. O'Brien, D. Brown, K. Karalis, and C. Pothoulakis. 2004. Corticotropin-releasing hormone (CRH) requirement in Clostridium difficile toxin A-mediated intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:8503–8508.
- Bhattacharyya, S., A. Kerzmann, and A. L. Feig. 2002. Fluorescent analogs of UDP-glucose and their use in characterizing substrate binding by toxin A from Clostridium difficile. *Eur. J. Biochem.* **269**:3425–3432.
- Burger, S., H. Tatge, F. Hofmann, I. Just, and R. Gerhard. 2003. Expression of recombinant Clostridium difficile toxin A using the Bacillus megaterium system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**:584–588.
- Busch, C., F. Hofmann, R. Gerhard, and K. Aktories. 2000. Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxin glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **275**:13228–13234.
- Busch, C., F. Hofmann, J. Selzer, J. Munro, D. Jeckel, and K. Aktories. 1998. A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J. Biol. Chem.* **273**:19566–19572.
- Genth, H., K. Aktories, and I. Just. 1999. Monoglucosylation of RhoA at threonine-37 blocks cytosol-membrane cycling. *J. Biol. Chem.* **274**:29050–29056.
- Genth, H., J. Huelsenbeck, B. Hartmann, F. Hofmann, I. Just, and R. Gerhard. 2006. Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by Clostridium difficile toxin B. *FEBS Lett.* **580**:3565–3569.
- Gerhard, R., H. Tatge, H. Genth, T. Thum, J. Borlak, G. Fritz, and I. Just. 2005. Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. *J. Biol. Chem.* **280**:1499–1505.
- Gerhard, R., S. Burger, H. Tatge, H. Genth, I. Just, and F. Hofmann. 2005. Comparison of wild type with recombinant Clostridium difficile toxin A. *Microb. Pathog.* **38**:77–83.
- Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. Von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories. 1995. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**:500–503.

12. **Just, I., M. Wilm, J. Selzer, G. Rex, C. Von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories.** 1995. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* **270**:13932–13936.
13. **Kim, H., S. H. Rhee, E. Kokkotou, X. Na, T. Savidge, M. P. Moyer, C. Pothoulakis, and J. T. LaMont.** 2005. Clostridium difficile toxin A regulates inducible COX-2 and PGE2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **280**:21237–21245.
14. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2003. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**:807–869.
15. **Mykoniatis, A., P. M. Anton, M. Wlk, C. C. Wang, L. Ungsunan, S. Blüher, M. Venihaki, S. Simeonidis, J. Zacks, D. Zhao, S. Souglioultzis, K. Karalis, C. Mantzoros, and C. Pothoulakis.** 2003. Leptin mediates Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology* **124**:683–691.
16. **Qa'Dan, M., M. Ramsey, J. Daniel, L. M. Spyres, B. Safiejko-Mrocza, W. Ortiz-Leduc, and J. D. Ballard.** 2002. Clostridium difficile toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cell. Microbiol.* **4**:425–434.
17. **Reinert, D. J., T. Jank, K. Aktories, and G. E. Schulz.** 2005. Structural basis for the function of Clostridium difficile toxin B. *J. Mol. Biol.* **351**:973–981.
18. **Savidge, T. C., W.-H. Pan, P. Newman, M. O'Brien, P. M. Anton, and C. Pothoulakis.** 2003. Clostridium difficile toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* **125**:413–420.
19. **Voth, D. E., and J. Ballard.** 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:247–263.
20. **Zhao, D., S. Kuhnt-Moore, H. Zeng, A. Pan, J. S. Wu, S. Simeonidis, M. P. Moyer, and C. Pothoulakis.** 2002. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves Rho family small GTPases. *Biochem. J.* **368**:665–672.

---

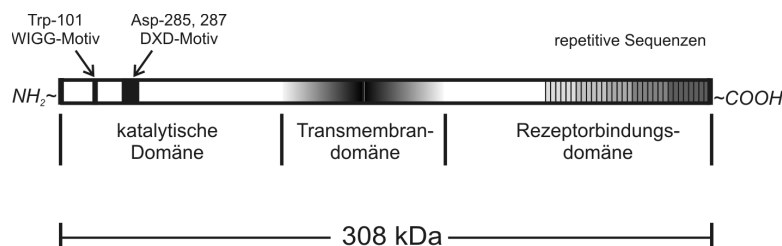
*Editor:* J. T. Barbieri

## 2. Zusammenfassung

### 2.1. Einleitung

*Clostridium difficile* wurde 1935 erstmals durch Hall and O'Toole als anaerobes, Gram-positives, sporenbildendes Bakterium beschrieben, das Bestandteil der normalen Darmflora bei Kindern ist (1). Durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika in den 70er und 80er Jahren traten gehäuft Fälle von sekretorischer Diarrhoe und pseudomembranöser Colitis auf, die auf eine Übersiedlung des Darms mit *C. difficile* zurückzuführen waren. Damit konnte diesen Bakterien zum ersten Mal eine Erkrankung mit klinischen Symptomen zugeordnet werden. Die Ursache für die Schädigung des Darmepithels und den damit verbundenen klinischen Symptomen sind zwei einkettige Exotoxine, die von dem Bakterium im vegetativen Zustand gebildet werden. Die Behandlung der Infektion ist wiederum nur durch die Gabe der spezifischen Antibiotika Metronidazol oder Vancomycin möglich. In Kanada, den USA und Großbritannien wurde seit 2002 ein gehäuftes epidemisches Auftreten von Infektionen mit besonders pathogenen *C. difficile* Stämmen beobachtet (2, 3). Die Ursache der hohen Virulenz soll eine vermehrte Toxinproduktion sein, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität der Erkrankung einhergeht.

Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) sind einsträngige Proteine mit einem Molekulargewicht von 308 kDa (Toxin A) bzw. 270 kDa (Toxin B), die eine typische Drei-Domänen-Struktur aufweisen (Abb. 1).

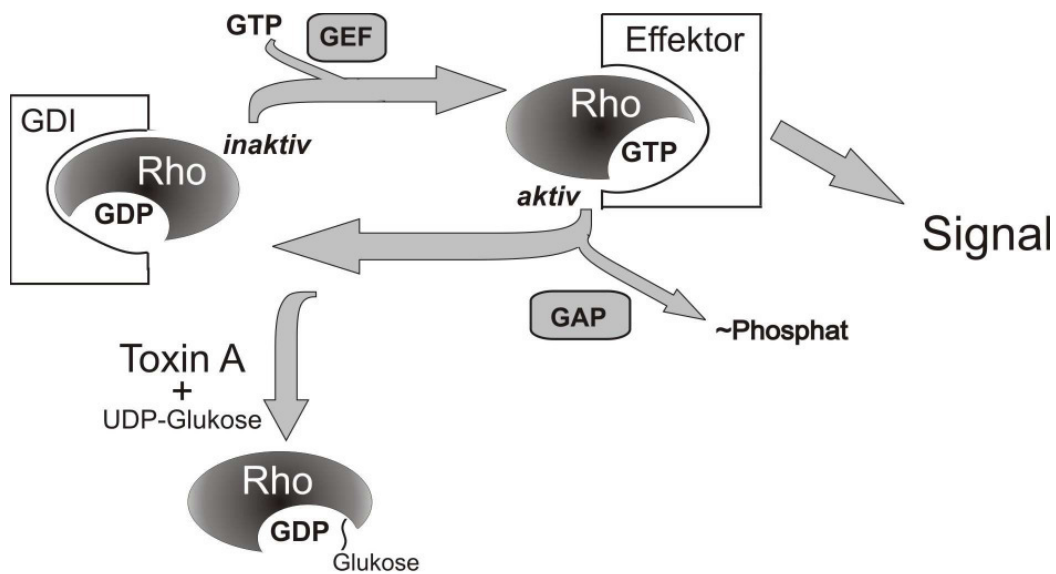


**Abb. 1** Drei-Domänenstruktur von *C. difficile* Toxin A

Der C-terminale Bereich des Toxins besteht aus repetitiven Oligopeptiden und bildet die Rezeptorbindedomäne, die die Bindung am putativen Rezeptor und die rezeptorvermittelte Endozytose ermöglicht. Die in der Mitte gelegene Transmembrandomäne besteht aus hydrophoben Aminosäuren; ihre Aufgabe ist vermutlich die Bildung einer Pore oder eines Kanals zur Translokation der katalytischen Domäne ins Zytosol. Der N-terminale Bereich des Toxins bildet die katalytische Domäne. Sie besitzt die Funktion einer Glucosyltransferase, die in Anwesenheit von Mn<sup>2+</sup> vom Cosubstrat UDP-Glucose eine Glucosegruppe auf Rho-GTPasen überträgt.

Der N-terminale Bereich, die katalytische Domäne, ist verantwortlich für die enzymatische Aktivität der Toxine. Der mittlere Teil des Proteins repräsentiert die Transmembrandomäne und besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren. Sie ist an der Membraninsertion und Translokation in das Zytosol beteiligt. Die Bindung an den putativen Rezeptor erfolgt am C-terminalen Bereich des Toxins, der aus 30 repetitiven Oligopeptiden besteht. Die katalytische Domäne besitzt die Funktion einer Glucosyltransferase, die nach Translokation in das Zytosol ihre Aktivität entfaltet. Zielmoleküle der Toxine sind die niedermolekularen Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42, die zur Superfamilie der Ras-GTPasen gehören. Die Hauptaufgabe der Rho-Proteine ist die Regulation des Aktinzytoskeletts und die damit verbundenen Funktionen der Aufrechterhaltung von Morphologie, Motilität, Zell-Zell-Kontakten sowie Endo- und Exozytose. Außerdem sind sie an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Unter dem Einfluss der Toxine A und B von *C. difficile* kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zellen, verursacht durch eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts.

Die Toxine übertragen die Glucosegruppe des ubiquitär vorkommenden Cosubstrats UDP-Glucose auf einen Threoninrest (Thr-37 bei RhoA, Thr-35 bei Rac1) der GTPasen (4). Die Glucosylierung verhindert die Interaktion mit den Effektorproteinen und somit die Signalweiterleitung nach distal (Abb. 2).



**Abb. 2 Aktivierungszyklus der Rho GTPase**

*Inaktives Rho liegt in GDP-gebundener Form assoziiert mit dem Guaninnucleotide-Dissociation-Inhibitor (GDI) vor. Kommt es durch Stimulation zur Rho-Aktivierung, wird durch einen Guaninnucleotide-Exchange-Faktor (GEF) GDP durch GTP ersetzt. Bei diesem Vorgang dissoziiert das Rho vom GDI. Das GTP-gebundene Rho ist nun in der Lage, an Effektorproteine zu binden und diese zur Signalweitergabe zu aktivieren. Die intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität von Rho wird durch ein GTPase-Activating-Protein (GAP) verstärkt, wodurch die Inaktivierung von Rho beschleunigt wird.*

*In Anwesenheit von Toxin A kommt es zur Monoglucosylierung von Rho. Diese Reaktion führt zu einer funktionellen Inaktivierung des Proteins, da dieses nicht mehr in der Lage ist, mit dem Effektorprotein zu interagieren.*

Die großen clostridialen Glucosyltransferasen besitzen in ihrer katalytischen Domäne homologe Aminosäurebereiche. Hierbei sind das DXD- und das WIGG-Motiv von essentieller Bedeutung. Das DXD-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Aspartat, beliebige Aminosäure und Aspartat, erfüllt die Funktion der Koordination eines Mangans als Cofaktor für die Glucosyltransferase-Aktivität. Der zweite konservierte Bereich, das WIGG-Motiv, bestehend aus der Aminosäure Tryptophan auf Position 101 (Toxin A) beziehungsweise 102 (Toxin B), ist an der Bindung des Cosubstrates UDP-Glucose beteiligt. Beide Motive sind somit essentiell für die enzymatische Aktivität des Enzyms. Aus Mutationen in diesen funktionell wichtigen Bereichen resultiert eine erhebliche Abnahme der enzymatischen Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im WIGG-Motiv der katalytischen Domäne vom letalen Toxin von *C. sordellii* und *C. difficile* Toxin B, bei der ein Austausch von Tryptophan 102 zu Alanin vorgenommen wurde, eine 1000-fach reduzierte Glucosyltransferase-Aktivität zur Folge hat. Ebenso verursacht der Austausch von Aspartat im DXD-Motiv

zu Alanin eine drastische Einschränkung der Enzymfunktion. Hier bewirkt der Austausch eines bzw. beider Aspartate eine vollständige Blockierung der zytotoxischen Effekte (5, 6).

## 2.2. Zielsetzung

Entgegen dem molekularen Wirkmechanismus ist der Ablauf der proinflammatorischen Wirkung von TcdA, die zur pseudomembranösen Colitis führt, noch weitestgehend unverstanden. TcdA-Mutanten mit reduzierter Glucosyltransferase-Aktivität sollen angewendet werden, um bisher unbekannte Glucosyltransferase-unabhängige Effekte des Toxins zu identifizieren. Die vorliegende Arbeit soll die Glucosyltransferase-Aktivität von rekombinant hergestelltem Wildtyp TcdA und der Mutanten TcdA D285/287N und TcdA W101A in einem zellfreien und einem zellulären System vergleichen und beschreiben. Die Charakterisierung der Mutanten beinhaltet die Erhebung grundlegender Daten zur Enzymaktivität der Holotoxine sowie der isolierten katalytischen Domänen in beiden Systemen. Basierend auf diesen Daten soll die Anwendbarkeit der Mutanten zur Differenzierung zwischen Glucosyltransferase-abhängigen und -unabhängigen Effekten überprüft werden. Die kürzlich neu beschriebene Hochregulation von RhoB als Sofortantwort von Zellen (7) dient als exemplarisches Beispiel, um eine Abhängigkeit dieses Effektes von der intrazellulären Glucosyltransferase-Aktivität von TcdA nachzuweisen.

## 2.3. Ergebnisse und Diskussion

Die Charakterisierung von rekombinanten TcdA D285/287N und TcdA W101A zeigte eine deutliche Reduzierung ihrer Glucosyltransferase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp Toxin: In einem zellfreien System wurde die enzymatische Aktivität von rTcdA mit 16,6 mol/mol\*min bestimmt. Die Aktivität von rTcdA W101A war um das 380-fache (0,044 mol/mol\*min) und von rTcdA D285/287N um das 5200-fache (0,003 mol/mol\*min) reduziert. Die N-terminalen Fragmente (Aminosäuren 1-1065) von rTcdA und rTcdA W101A zeigten die gleiche Glucosyltransferase-Aktivität wie die entsprechenden Holotoxine, jedoch lag die Aktivität von rTcdA D285/287N unterhalb der Detektionsgrenze.

Im Gegensatz zum rekombinanten System war der zytopathische Effekt (Abrunden der Zellen) von rTcdA W101A im Vergleich mit Wildtyp rTcdA im zellulären System nur um

den Faktor 50 herabgesetzt. Eine sequentielle [<sup>14</sup>C]Glucosylierung von Rho GTPasen aus dem Lysat Toxin-behandelter Zellen bestätigte eine Korrelation des zytopathischen Effektes mit der intrazellulären Glucosyltransferase-Aktivität von rTcdA W101A. Die Doppelmutante rTcdA D285/287N zeigte keinerlei zytopathische Aktivität.

Die Ursache der Aktivitätssteigerung von rTcdA W101A im zellulären System wurde mittels Elektroporation untersucht. Mit Hilfe dieser Methode wurden die N-terminalen Toxinfragmente (Aminosäuren 1-1065) unter Umgehung der aktiven Endozytose in Caco-2 Zellen gebracht. Somit konnten Konformationsänderungen durch den Aktivierungsprozess im sauren Endosom und nach der Membraninsertion ausgeschlossen werden. Analog zu den Holotoxinen zeigten sich identische zytopathische Effekte und Veränderungen des transepithelialen Widerstandes nach Einbringen der Toxinfragmente rTcdA und rTcdA W101A im Verhältnis 1:50. Daraus konnte geschlossen werden, dass die intrazellulären Bedingungen, nicht aber der Aufnahmeprozess, ursächlich für die unterschiedliche Glucosyltransferase-Aktivität von rTcdA W101A im zellfreien und zellulären System sind.

Die Anwendbarkeit der TcdA-Mutanten zur Bestimmung einer Glucosyltransferase-Abhängigkeit von Effekten wurde anhand der RhoB-Hochregulation überprüft. Es konnte eine klare Abhängigkeit der Toxin-induzierten RhoB-Hochregulation von der Glucosyltransferase-Aktivität von TcdA nachgewiesen werden.

Das vorliegende rTcdA und seine Mutanten sind derzeit weltweit die einzigen rekombinanten Holotoxine von TcdA. Das große Potential dieser Holotoxin-Mutanten besteht in der Verfügbarkeit für tierexperimentelle Untersuchungen. Bereits beschriebene Mutationen der katalytischen Domäne des homologen TcdB können dafür nicht verwendet werden, da sie nicht in die Zielzelle aufgenommen werden. Langfristig ist daher die Verwendung der TcdA-Mutanten am tierexperimentellen Modell geplant, um Befunde aus der Zellkultur am Organismus zu überprüfen.

## 2.4. Literatur

1. **Hall, IC., O'Tool, E.** Intestinal flora in newborn infants with an description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49: 390-402
2. **Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., McDonald, L.C.** Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 2005 Sep 24-30; 366 (9491): 1079-1084
3. **van den Hof, S., van der Kooi, T., van den Berg, R., Kuijper, E.J., Notermans, D.W.** *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 outbreaks in the Netherlands: recent surveillance data indicate that outbreaks are not easily controlled but interhospital transmission is limited. Eurosurveillance 2006; 11 (1): 060126
4. **Just, I., Selzer, J., Wilm M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K.** Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. Nature 1995; 351; 500-503.
5. **Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, J., Jeckel, D., Aktories, K.** A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. J Biol Chem 1998; 273; 19566-19572
6. **Busch, C., Hofmann, F., Gerhard, R., Aktories, K.** Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxins glycosyltransferases. J Biol Chem 2000; 275: 13228-13234
7. **Gerhard, R., Tatge, H., Genth, H., Thum, T., Borlak, J., Fritz, G., Just, I.** *Clostridium difficile* toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. J. Biol. Chem. 2005; 280; 1499-1505

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

geboren am 29. Mai 1978 in Bremen  
Familienstand ledig

### Schullaufbahn

---

1984-1988 Grundschule Grasberg  
1988-1990 Orientierungsstufe Worpswede  
1990-1994 Realschule Grasberg  
1994-1996 Höhere Handelsschule Bremen

08/2001-02/2002 Immaturenkurs am Bildungswerk ver.di, Hannover

Abschluss fachbezogene Hochschulzugangsberechtigung für den Studiengang Medizin

### Berufsweg

---

1996-1999 Ausbildung zum Physiotherapeuten, Bremer Lehrinstitut für Physiotherapie  
2000-2001 angestellter Physiotherapeut, Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme  
2001-2002 freiberufliche Tätigkeit als Physiotherapeut, Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme

### Zivildienst

---

1999-2000 Physikalische Therapie, Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme

### Fortbildungen

---

Manuelle Therapie nach dem Maitland Konzept Level 1a  
Brügger Therapie nach dem Murnauer Konzept  
PNF Grundkurs  
Manuelle Lymphdrainage

### Studium

---

10/2002-12/2008 Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule Hannover  
08-09/2004 Ärztliche Vorprüfung  
10-12/2008 2. Ärztliche Prüfung

## Famulaturen

---

07/2005-08/2005	Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover
08/2006-09/2006	Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover
09/2006-10/2006	Rheumatologie, Medizinische Hochschule Hannover
04/2007-05/2007	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Windhorst, Vlotho

## Praktisches Jahr

---

08/2007-12/2007	Klinische Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover
12/2007-03/2008	Innere Medizin, Klinikum Minden
03/2008-07/2008	Chirurgie, Robert-Koch-Krankenhaus Gehrden

## Dissertation

---

Thema	Charakterisierung von mutiertem <i>Clostridium difficile</i> Toxin A zur Bestimmung von Glukosyltransferase-abhängigen Effekten
Betreuer	PD Dr. rer. nat. Ralf Gerhard Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover

## Ärztliche Tätigkeit: Facharztausbildung für Klinische Pharmakologie

---

seit dem 01/2009	Fraunhofer Institut Hannover, Abteilung für klinische Atemwegsforschung
------------------	---

## Veröffentlichungen

---

Teichert M, Lüer K, Stichtenoth DO. Geben oder nicht geben? Zur Indikationsstellung für CSE-Hemmer („Statine“). Med Monatsschr Pharm. Mai 2008: 184-85

Teichert M, Stichtenoth DO. Heilkraft vom Amazonas? Mobil 2008; 1: 21

Teichert M, Stichtenoth DO. Circulus vitiosus – Behandlungsoptionen bei Chemotherapie-induzierter Polyneuropathie. Niedersächsisches Ärzteblatt. Januar 2008: 56-57

Teichert M, Just I, Stichtenoth DO. Babypause? – Homöopathische Medikamente in der Schwangerschaft?. Niedersächsisches Ärzteblatt. Dezember 2007: 58-59

Teichert M, Tatge H, Schoentaube J, Just I, Gerhard R. Application of mutated *Clostridium difficile* toxin A for determination of glucosyltransferase-dependent effects. Infect Immun. Oct 2006; 74: 6006-10

Teichert M, Tatge H, Gerhard R. Comparison of *Clostridium difficile* toxin A and its W101A mutant in a cellular und cell free system. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology. März 2006: 56-56

Barsinghausen, 09.03.2009

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ingo Just, dem Direktor des Institutes für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Bereitstellung des Themas und die immer gewährte Unterstützung bedanken.

Ganz besonders danke ich natürlich Dr. rer. nat. Ralf Gerhard für seine ständige Präsenz, die Hilfe bei den Versuchen und praktischen Durchführungstipps. Ohne seine Anleitung und unermüdliche Geduld wäre eine so zeitige Fertigstellung meiner Arbeit nicht vorstellbar gewesen.

Ein ganz großes Dankeschön weiter allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für das stets sehr herzliche und freundschaftliche Klima. Insbesondere danke ich Helma Tatge für die Hilfe bei der Herstellung der Toxine, die für diese Arbeit notwendig waren. Darüber hinaus hat sie mir stets gut zugesprochen und mich wieder aufgebaut, wenn ich frustriert war.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel '*Charakterisierung von mutiertem Clostridium difficile Toxin A zur Bestimmung von Glucosyltransferase-abhängigen Effekten*' im Institut für Toxikologie unter der Betreuung von PD Dr. rer. nat. Ralf Gerhard ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

1. **Teichert, M., Tatge, H., Schöntaube, J., Just, I., Gerhard, R.** Application of mutated Clostridium difficile toxin A for determination of glucosyltransferase-dependent effects. *Infection and Immunity*, 74 (10): 6006-6010 Oct. 2006
2. **Teichert, M., Tatge, H., Gerhard, R.** Comparison of Clostridium difficile toxin A and its W101A mutant in a cellular und cell free system. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 372; 56-56 183 Suppl. 1 März 2006

Hannover, den 08.03.2009