

Aus dem Institut für Toxikologie der
Medizinischen Hochschule Hannover

**Unterschiede in der biologischen Wirkung des
Clostridium difficile Toxin B in proliferierenden und
nicht-proliferierenden Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

in der Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Marta Anna Lica
aus Stolp
Hannover 2011

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 08.03.2012.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. rer. nat. Harald Genth

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Hofreuter

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Volkhard Kaefer

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2012

Prüfungsausschussmitglieder: Prof. Dr. med. Roland Seifert,
Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Schumann,
Prof. Dr. med. Jens Jordan

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation.....	1
2. Zusammenfassung.....	10
2.1 Einleitung	10
2.1.1 <i>C. difficile</i> -assoziierte Diarrhoe	10
2.1.2 Clostridiale glucosylierende Toxine	11
2.1.3 Funktionelle Auswirkungen der Hemmung niedermolekularer GTP-bindender Proteine der Rho-Familie durch <i>C. difficile</i> Toxine	12
2.1.4 Regeneration des Kolonepithels	12
2.1.5 Apoptose und Nekrose.....	13
2.2 Zielsetzung.....	15
2.3 Ergebnisse	15
2.4 Diskussion.....	17
2.5 Literaturverzeichnis	20
3. Lebenslauf.....	22
4. Danksagung	24
5. Eidesstattliche Erklärung	25

Difference in the biological effects of *Clostridium difficile* toxin B in proliferating and non-proliferating cells

Marta Lica · Florian Schulz · Ilona Schelle ·
Martin May · Ingo Just · Harald Genth

Received: 12 November 2010 / Accepted: 21 December 2010 / Published online: 7 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) from *Clostridium difficile* are the causative agents of the *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD) and its severe form, the pseudomembranous colitis. TcdA and TcdB both glucosylate and thereby inactivate low molecular weight GTP-binding proteins of the Rho, Rac, and Cdc42 subfamilies. In cultured cell lines, TcdB induces actin re-organization and bi-nucleation (“cytopathic effects”) and cell death (“cytotoxic effects”). In this study, the role of cell cycle progression in the cytopathic and the cytotoxic effects of TcdB is evaluated by a differential analysis of these effects in proliferating and non-proliferating cells. Density-synchronized murine fibroblasts and confluent HT29 colonocytes are exploited as cell culture models for non-proliferating cells. Cell death is analyzed in terms of a loss of cell viability, phosphatidylserine exposure, and DNA fragmentation. In proliferating cells, TcdB blocks cell proliferation and induces apoptotic cell death. In contrast, TcdB induces non-apoptotic cell death in non-proliferating cells. TcdB-induced cell rounding turns out to be independent of cell cycle progression. Cell cycle progression is an important determinant in the biological effects of TcdB. With respect to the pathology of CDAD, this study leads to the new hypothesis that necrotic cell death of terminally

differentiated colonocytes and inhibition of epithelial renewal of the colon contribute to the pathogenesis of CDAD.

Keywords Apoptosis · Necrosis · Actin re-organization · Diarrhea · Glucosylation · Rho

Abbreviations

CDAD *C. difficile*-associated diarrhea
PMC Pseudomembranous colitis
TcdA Toxin A from the *C. difficile* strain VPI10463
TcdB Toxin B from the *C. difficile* strain VPI10463

Introduction

The family of clostridial glucosylating toxins (formerly classified as “large clostridial cytotoxins”) encompasses toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) from *Clostridium difficile* and lethal toxin and hemorrhagic toxin from *Clostridium sordellii* (Aktories and Just 2005). TcdA and TcdB are the causative agents of the *C. difficile*-associated diarrhea (CDAD) and its severe form, the pseudomembranous colitis (PMC) (Voth and Ballard 2005). TcdA and TcdB are classified as broad-spectrum inhibitors of Rho proteins, as both toxins mono-glucosylate Rho, Rac, and Cdc42 subtype proteins (Genth et al. 2008). Mono-glucosylation of Rho proteins at Thr-35/Thr-37 causes their functional inactivation due to impaired coupling to their effector and regulatory proteins (Genth et al. 1999; Sehr et al. 1998). In cultured cell lines, glucosylation of Rho proteins results in actin re-organization (“cytopathic effects”). The cytopathic effects include the loss of features of the actin cytoskeleton (actin stress fibers, peripheral membrane ruffling, and filopodial extensions), the disorgani-

This article is published as part of the special issue on bacterial toxins.

M. Lica · F. Schulz · I. Schelle · M. May · I. Just · H. Genth
Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover,
30625 Hannover, Germany

H. Genth (✉)
Institut für Toxikologie OE 5340,
Medizinische Hochschule Hannover,
Carl-Neuberg-Str. 1,
30625 Hannover, Germany
e-mail: genth.harald@mh-hannover.de

zation of focal complexes, and the inhibition of contractile ring formation in cytokinesis. Treatment of cultured cells with TcdA/TcdB thus results in rounded, bi-nucleated cells. Rac glucosylation has been suggested to be critical for cell rounding, while RhoA glucosylation is critical for bi-nucleation (Halabi-Cabezon et al. 2008; Huelsenbeck et al. 2009).

Upon treatment with higher toxin concentrations or prolonged treatment, TcdA and TcdB induce cell death in cultured cell lines (“cytotoxic effects”). Most reports refer to apoptosis as the relevant type of cell death induced by the *C. difficile* toxins (Huelsenbeck et al. 2007a; Kim et al. 2007; Nottrott et al. 2007; Voth and Ballard 2005). There are few reports, however, suggesting that TcdA and TcdB are also capable of inducing necrotic cell death (Solomon et al. 2005; Warny et al. 2000).

Although apoptosis and necrosis are two mutually exclusive ways of cell demise, either option is present in the cell. The determinant why the *C. difficile* toxins induce apoptosis or necrosis has not been evaluated. In general, the mode of cell death depends on the status of cellular energy, the duration and extent of the insult, or the state of cell cycle progression. The onset of apoptosis is markedly asynchronous across a population of cells (Mills et al. 1998). Using cells synchronized with the thymidine double-block technique, S-phase cells have turned out to be most susceptible to TcdB-induced apoptosis (Huelsenbeck et al. 2007a, b). In turn, one must expect that a cell population devoid of cell proliferation (in particular of S-phase transition) is not susceptible to TcdB-induced apoptosis. In this study, density-synchronized fibroblasts are exploited as a cell culture system with non-proliferating cells present in G1-phase, which does not enter S phase. Here, we show that non-proliferating cells are not susceptible to TcdB-induced apoptosis but undergo non-apoptotic (likely necrotic) cell death. This study shows that cell cycle progression (1) contributes to the biological effects of TcdB and (2) may be a critical determinant for the mode of cell death induced by TcdB.

Methods

Materials The materials used included 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Serva), Hoechst 33342 trihydrochloride (Cambrex), [³²P]NAD (Biotrend), propidium iodide (Fluka), caspase inhibitor I (Z-VAD(OMe)-FMK) (Calbiochem), and WST-1 reagent (Roche). TcdB was purified from *C. difficile* strains VPI 10463 (Genth et al. 2000). Exoenzyme C3 from *C. botulinum* was expressed in *Escherichia coli* using the pGEX-2 T vector system and purified with GSH Sepharose beads (AP Biotech) as described (Wilde et al. 2003).

Cell culture The colonic crypt cell line HT-29 was cultured under standard conditions in medium supple-

mented with 10% fetal bovine serum, 100 μM penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. NIH3T3 fibroblasts were cultivated in Dulbecco's modified essential medium (Biocrom, +10% FCS, 100 μg/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, and 1 mM sodium pyruvate) at 37°C and 5% CO₂. Cell populations that were obtained upon incubation for 24 h in serum-supplemented medium were proliferating. Density-synchronized fibroblasts or confluent HT29 were obtained upon incubation for 72 h in serum-supplemented medium, with fresh medium being provided after 48 h.

Cell lysis and sequential ADP ribosylation Cells treated with TcdB or buffer were washed and lysed in a buffer containing NaCl (150 mM), TRIS (50 mM, pH 7.2), MgCl₂ (5 mM), PMSF (1 mM), and NP40 (1%). After sonication, the soluble fraction was prepared by centrifugation (10 min 16,000×g). Soluble fractions were incubated with *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme (C3-bot) in the presence of 1 μM NAD at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by addition of Laemmli sample buffer. Subsequently, the samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by phosphorimaging.

Analysis of apoptosis—analysis of apoptosis After toxin treatment, annexin V labeled with Alexa Fluor 488 (Cambrex) was added directly into the medium (1:50) to visualize phosphatidyl serine exposure. Cells were analyzed by fluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert 200 M (Alexa Fluor 488: excitation 470 nm, emission 515 nm).

DNA flow cytometry DNA content was determined by flow cytometry. Cells (1 × 10⁶) were washed in phosphate-buffered saline and fixed in 70% ethanol on ice for 30 min. The cells were then centrifuged at 400×g for 5 min. Subsequently, they were stained with propidium iodide (150 μg/ml in phosphate-buffered saline supplemented with 1% bovine serum albumin and 1% Triton X-100). RNA was removed by incubation with 0.1 mg/ml RNase A at 24°C for 30 min. The stained cells were analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). A sequence of single-parameter DNA histograms was analyzed to estimate the proportions of cells in each phase.

WST-1 viability assay Cell viability was estimated by utilizing 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolo]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) (Roche) and was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells inoculated in microtiter plates (96-well tissue culture grade, flat bottom) were exposed to TcdB for 24 h. Subsequently, WST-1 was added into each well. WST-1 is a tetrazolium salt (4-[3-(4-iodophenyl)-2H-5-tetrazolo]-1-3-benzene disulfonate) that is reduced to formazan by mitochondrial dehydrogenases. Quantification of formazan dye was done using a scanning multiwell spectrophotometer at 450 nm.

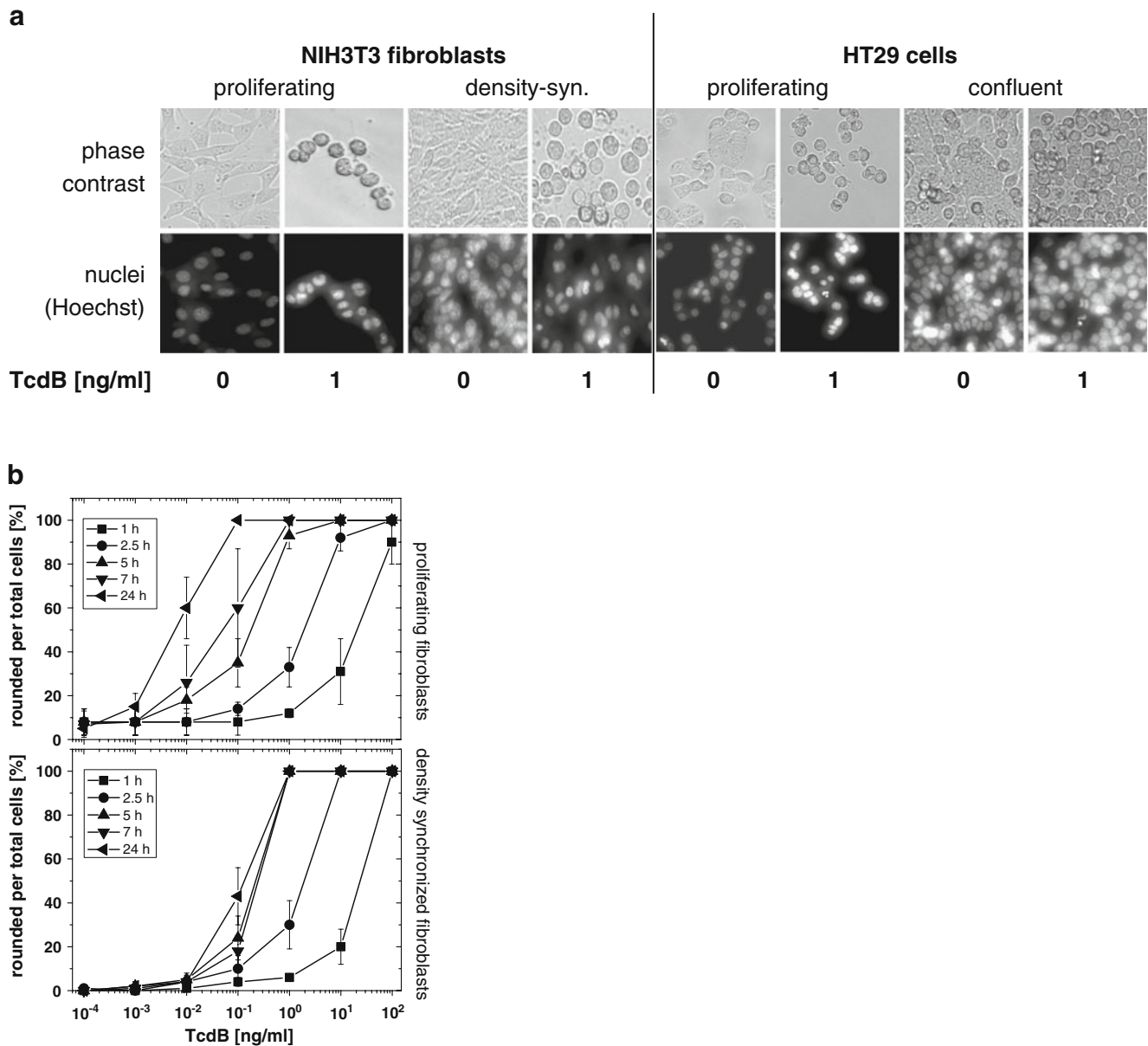


Fig. 1 Cytopathic effects of TcdB in proliferating and non-proliferating cells. NIH3T3 fibroblasts (proliferating or density-synchronized as indicated) and HT29 cells (proliferating or confluent as indicated) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer. **a** Cell morphology was analyzed using phase-contrast

microscopy upon TcdB treatment for 24 h. The nuclei were visualized using Hoechst staining and fluorescence microscopy. **b** TcdB-induced cell rounding was quantified as rounded per total cells in percent upon TcdB treatment with the indicated concentrations for the indicated times

Results

Generation of non-proliferating cell population by density synchronization

Density synchronization was applied to block (NIH3T3 fibroblasts) or at least to reduce (HT29 cells) cell cycle progression and cell proliferation of cultured cells. Cultivation of NIH3T3 fibroblasts for 72 h resulted in the formation of a dense monolayer of cells (Fig. 1a). Confluent

fibroblasts exhibited a DNA content of 2 N, as determined by FACS analysis of propidium-iodide-stained cells (Fig. 2) (Table 1), showing that the complete population of confluent fibroblasts was present in G1/0 phase. In contrast, a subconfluent population of fibroblasts exhibited the typical distribution of a proliferating population throughout all phases of the cell cycle: G1-phase cells (cells with a DNA content of 2 N, about 50% of total cells), S-phase cells (about 25% of total cells), and G2-M-phase cells (cell with a DNA content of 4 N, about 25% of total

cells) (Fig. 2) (Table 1). Furthermore, G1/0 fibroblasts and subconfluent fibroblasts were further analyzed for cell proliferation using the WST-1 test. This assay determines the activity of cellular dehydrogenases (“cell viability”). Increased cell viability is often interpreted as cell proliferation. The viability of a proliferating population of fibroblasts increased by about a factor of 2.5 within 24 h (Fig. 3). In contrast, the cell viability of density-synchronized fibroblasts did not increase within 24 h (Fig. 3), confirming that proliferation was blocked.

Colonocytes are regarded as the target cells of the *C. difficile* toxins (Voth and Ballard 2005). The colonic crypt cell line HT-29 is an often-exploited cell culture model for the analysis of the toxins’ effects (Kuehne et al. 2010; Nottrott et al. 2007). In contrast to fibroblasts, HT29 cells turned out not to be fully susceptible to density synchronization, as confluent HT29 cells started growing in the third dimension in a culture dish (Fig. 1a). Consistently, confluent HT29 cells were not exclusively present in G1/G0 phase. Subpopulations were also present in S phase and in G2-M phase (data not shown). Accordingly, the cell viability of confluent HT29 cells still increased by about a factor of 1.6, confirming that HT29 cells were only partially susceptible to density synchronization (Fig. 3). The cell viability of a proliferating population of HT29 cells increased by about a factor of 2.2 within 24 h (Fig. 3). Other cultured epithelial cell lines including Hela cells or Caco2 cells also turned out not to be susceptible to density synchronization (data not shown). In this study, confluent HT29 cells were exploited as a cellular model with reduced proliferation.

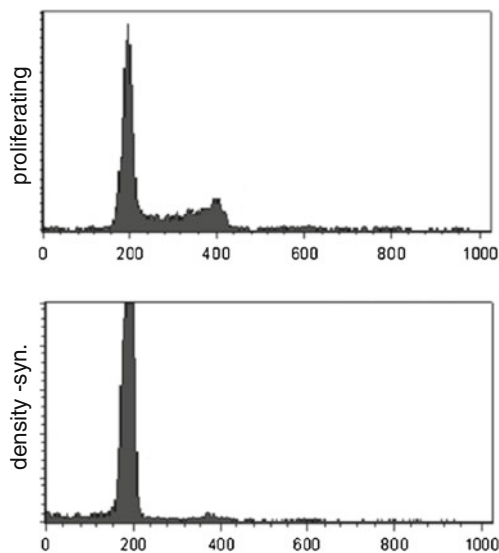


Fig. 2 Density synchronization of NIH3T3 fibroblasts. NIH3T3 fibroblasts (proliferating or density-synchronized as indicated) were stained with propidium iodide and analyzed for DNA content using flow cytometry

Table 1 Difference in the cell cycle effects of TcdB in proliferating and non-proliferating NIH3T3 fibroblasts

TcdB (ng/ml)	Proliferating				Density-syn.			
	0	1	10	100	0	1	10	100
G2/M	25	53	52	24	5	8	7	2
S	23	5	4	5	4	5	4	3
G1	50	39	38	31	88	81	82	85
sub G1	2	3	6	40	2	6	7	10

Mean values (% of total cells); $n=3-5$

Role of cell cycle progression in the cytopathic effects of TcdB

Treatment of fibroblasts or HT29 cells with TcdB resulted in actin re-organization (cell rounding) in both proliferating and non-proliferating fibroblasts (Fig. 1a). TcdB-induced cell rounding was analyzed in a time- and a TcdB-concentration-dependent manner. At TcdB concentrations of <1 ng/ml, TcdB less efficiently induced cell rounding in non-proliferating compared with proliferating fibroblasts (Fig. 1b). Given that TcdB uptake was the rate-limiting step in TcdB-induced cell rounding, this finding reflected that TcdB was more efficiently taken up into proliferating compared with non-proliferating fibroblasts. The kinetics of cell rounding was comparable in proliferating and non-proliferating fibroblasts at TcdB concentrations of ≥ 1 ng/ml at any given time of toxin treatment (Fig. 1b). TcdB concentrations of ≥ 1 ng/ml were thus apparently sufficient to ensure TcdB uptake in both proliferating and non-proliferating fibroblasts with comparable kinetics. The

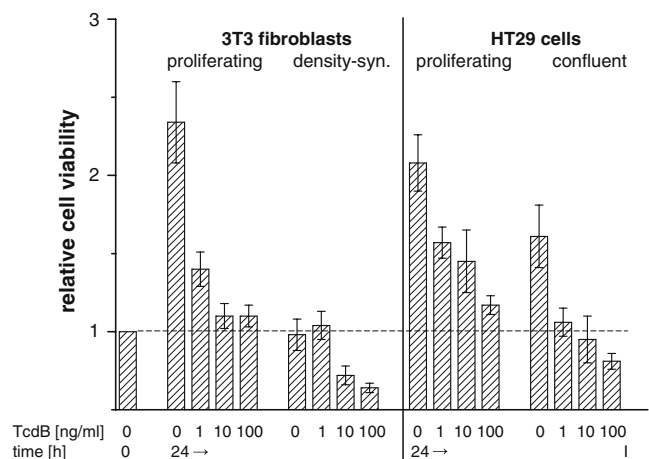


Fig. 3 Influence of TcdB on cell viability. NIH3T3 fibroblasts (proliferating or density-synchronized as indicated) and HT29 cells (proliferating or confluent as indicated) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer for 24 h. Cell viability was analyzed using WST-1 test. Cell viability is given relative to the cell viability at the beginning of TcdB treatment

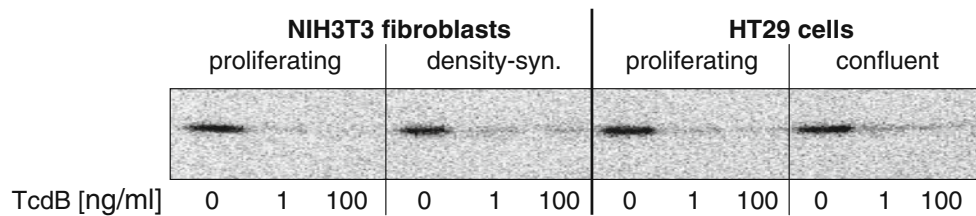


Fig. 4 Rho glucosylation by TcdB. NIH3T3 fibroblasts (proliferating or density-synchronized as indicated) and HT29 cells (proliferating or confluent as indicated) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer for 24 h. Cells were then lysed and the lysates

incubated with or without *C. botulinum* C3 exoenzyme in the presence of 1 μ M NAD for 30 min. The reaction was terminated by addition of Laemmli sample buffer. Autoradiography of the SDS-PAGE showing [32 P]ADP-ribosylated Rho is presented

basal level of rounded cells was higher in proliferating fibroblasts, while the basal level of rounded cells in non-proliferating cells was almost zero (Fig. 1b). The basal level of rounded cells reflected mitotic cell rounding, which was present in proliferating but absent in non-proliferating fibroblasts.

TcdB-induced actin re-organization is well established as based on the glucosylation of Rho proteins (Halabi-Cabezón et al. 2008). The glucosylation of RhoA was analyzed by sequential ADP ribosylation of RhoA using C3-bot (Genth et al. 2006; Genth et al. 2008). This method recognizes glucosylation of RhoA in terms of decreasing (sequential) ADP ribosylation (Fig. 4). Upon treatment with TcdB, RhoA from either fibroblasts or HT29 cells was not ADP-ribosylated by C3-bot, showing that RhoA was completely glucosylated in both proliferating and non-proliferating populations upon TcdB treatment. These findings suggested that TcdB uptake into proliferating and non-proliferating cells was comparable and that TcdB-induced Rho glucosylation and actin re-organization were independent of cell cycle progression.

Glucosylation of RhoA by TcdB prevents contractile ring formation in cytokinesis, while RhoA glucosylation does not prevent karyokinesis (Huelsenbeck et al. 2009). TcdB treatment thus results in inhibited cell division and the formation of bi-nucleated cells (Huelsenbeck et al. 2009). Upon treatment with a cytopathic TcdB concentration (1 ng/ml) for 24 h, about 45% of proliferating fibroblasts (20% of proliferating HT29 cells) were bi-nucleated (Figs. 1 and 5). The lower yield of bi-nucleated HT29 (compared with that of fibroblasts) cells correlates with the higher doubling time of HT29 cells (24 h in HT29 cells versus 18 h in fibroblasts). Expectedly, TcdB-induced bi-nucleation was clearly reduced in non-proliferating fibroblasts or confluent HT29 cells (Fig. 5). TcdB-induced bi-nucleation was reflected by an increase of 4 N cells (G2-M population) and a decreased number of 2 N cells (G1 population) and S-phase cells (Fig. 6) (Table 1). Bi-nucleation thus depended on cell cycle progression, in particular on M-phase transition. The formation of bi-nucleated cells reflected inhibited cell division and cell proliferation. TcdB-induced inhibition

of cell proliferation was reflected by a reduced increase in cell viability (Fig. 3): cell viability increased in TcdB-treated proliferating fibroblasts by a factor of 1.5 (HT29 cells 1.5) compared with a factor of 2.3 (2.2 in HT29 cells) in non-treated cells (Fig. 3). In non-proliferating fibroblasts, TcdB treatment did not expectedly affect cell viability. Taken together, TcdB-induced inhibition of contractile ring formation resulted in inhibited cell proliferation.

Role of cell cycle progression in the cytotoxic effects of TcdB

Treatment with a cytotoxic concentration of TcdB (100 ng/ml) resulted in cell rounding (Fig. 7) and complete Rho glucosylation (Fig. 4) in both fibroblasts and HT29 cells, regardless of the cells proliferating or not. Interestingly, the formation of bi-nucleated cells was clearly reduced in fibroblasts treated with a cytotoxic concentration of TcdB (100 ng/ml) (Fig. 5). Accordingly, the number of 4 N cells (G2-M cells) was clearly reduced (Fig. 6) (Table 1). Instead, TcdB induced cell death. In proliferating cells, TcdB induced phosphatidylserine exposure, as analyzed in terms of

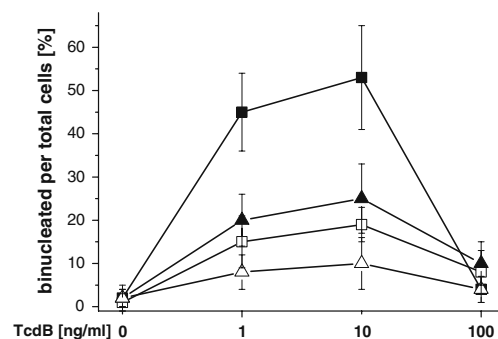


Fig. 5 Difference in TcdB-induced bi-nucleation in proliferating and non-proliferating cells. Proliferating fibroblasts (filled squares), density-synchronized fibroblasts (empty squares), proliferating HT29 cells (filled triangles), or confluent HT29 cells (empty triangles) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer for 24 h. The nuclei were visualized using Hoechst V staining. The formation of bi-nucleated cells is quantified as bi-nucleated per total cells in percent

annexin V staining (Fig. 7a). About 40% of the fibroblasts (30% of the HT29 cells) were annexin-V-positive upon TcdB treatment for 24 h (Fig. 7b). In fibroblasts (not in HT29 cells), TcdB further induced a loss of membrane integrity, as analyzed in terms of a loss of DAPI exclusion (Fig. 7a). In proliferating HT29 cells, TcdB thus induced a cell death phenotype that might be classified as “early apoptotic”, while the cell death phenotype observed in proliferating fibroblasts was referred to as “late apoptotic”. Interestingly, neither phosphatidylserine exposure (Fig. 7a, b) nor DNA fragmentation (Fig. 6) (Table 1) were observed in TcdB-treated non-proliferating fibroblasts. TcdB-induced phosphatidylserine exposure was reduced in confluent HT29 cells (Fig. 7a, b). These findings suggest that phosphatidylserine exposure and DNA fragmentation (as markers of apoptotic cell death) depended on cell cycle progression.

The loss of membrane integrity is a hallmark of necrotic cell death. TcdB induced a loss of membrane integrity in almost the complete population of non-proliferating fibroblasts, showing that this aspect of TcdB-induced cell death was most likely independent of cell cycle progression. Necrotic cell death is further characterized by a loss of cell viability. In non-proliferating G0/1 fibroblasts as well as in confluent HT29 cells, cell viability decreased upon treatment with TcdB (100 ng/ml) (Fig. 3), supporting the view that TcdB induced necrotic cell death in non-proliferating cells. In contrast, cell viability in proliferating fibroblasts as well as in HT29 cells was not reduced upon treatment with TcdB (100 ng/ml) for 24 h, indicating that these cells were in fact apoptotic. Apoptotic cell death required the metabolic activity of the cell. These findings showed that TcdB induced apoptosis in proliferating cells, while in non-proliferating cells TcdB rather induced necrotic cell death.

Discussion

Differential analysis of TcdB-induced apoptosis in proliferating and density-synchronized non-proliferating cells reveals that TcdB specifically induces apoptosis in proliferating (but not in non-proliferating) cells. Apoptosis was thereby analyzed in terms of cell viability, phosphatidylserine externalization, and the abundance of sub-G1 cells. Density-synchronized cells are not protected from TcdB-induced cell death, as cell viability of these populations decreased. As early loss of cell viability is a hallmark of necrosis, TcdB is likely to induce necrosis in non-proliferating cells. In contrast, cell viability does not decrease in a (proliferating) cell population treated with a cytotoxic concentration of TcdB. As metabolic activity is critical for apoptosis execution, apoptotic cell death appears to be the predominant type of cell death in proliferating cells. Taken together, these data strongly suggest that cell cycle progression determines the type of cell death induced by TcdB.

One earlier study differentially analyzed TcdB-induced apoptosis in proliferating and confluent cells and also found that proliferating epithelial cells were less susceptible to TcdB-induced apoptosis compared with confluent epithelial cells (Fiorentini et al. 1998). Regardless of the low susceptibility of confluent cells to apoptosis induced by the *C. difficile* toxins, confluent populations of cultured colonocytes (such as Caco2, HT29, and T84 cells) have often been exploited to study TcdA-/TcdB-induced apoptosis. The low susceptibility has been overcome by either prolonged toxin treatment (≥ 48 h) or increased toxin concentrations (Fiorentini et al. 1998; Mahida et al. 1996; Nottrott et al. 2007). The mechanism of apoptosis initiation

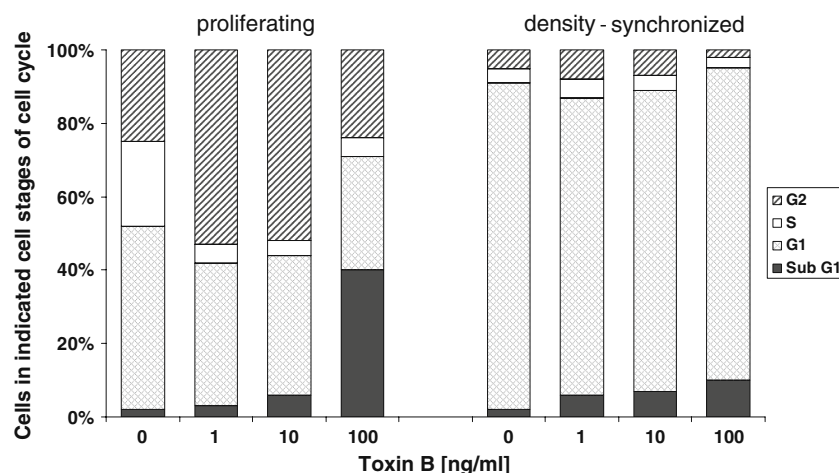


Fig. 6 Difference in TcdB-induced bi-nucleation and DNA fragmentation in proliferating and non-proliferating cells. NIH3T3 fibroblasts (proliferating or density-synchronized as indicated) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer for 24 h. Cells were stained with propidium iodide and analyzed for DNA content using

flow cytometry. The number of cells exhibiting a DNA content of either <2 N (sub-G1 cells), 2 N (G1 cells), 2 to 4 N cells (S-phase cells), and 4 N (G2-M cells or tetraploids in G1 phase) is given relative to the number of total cells in percent

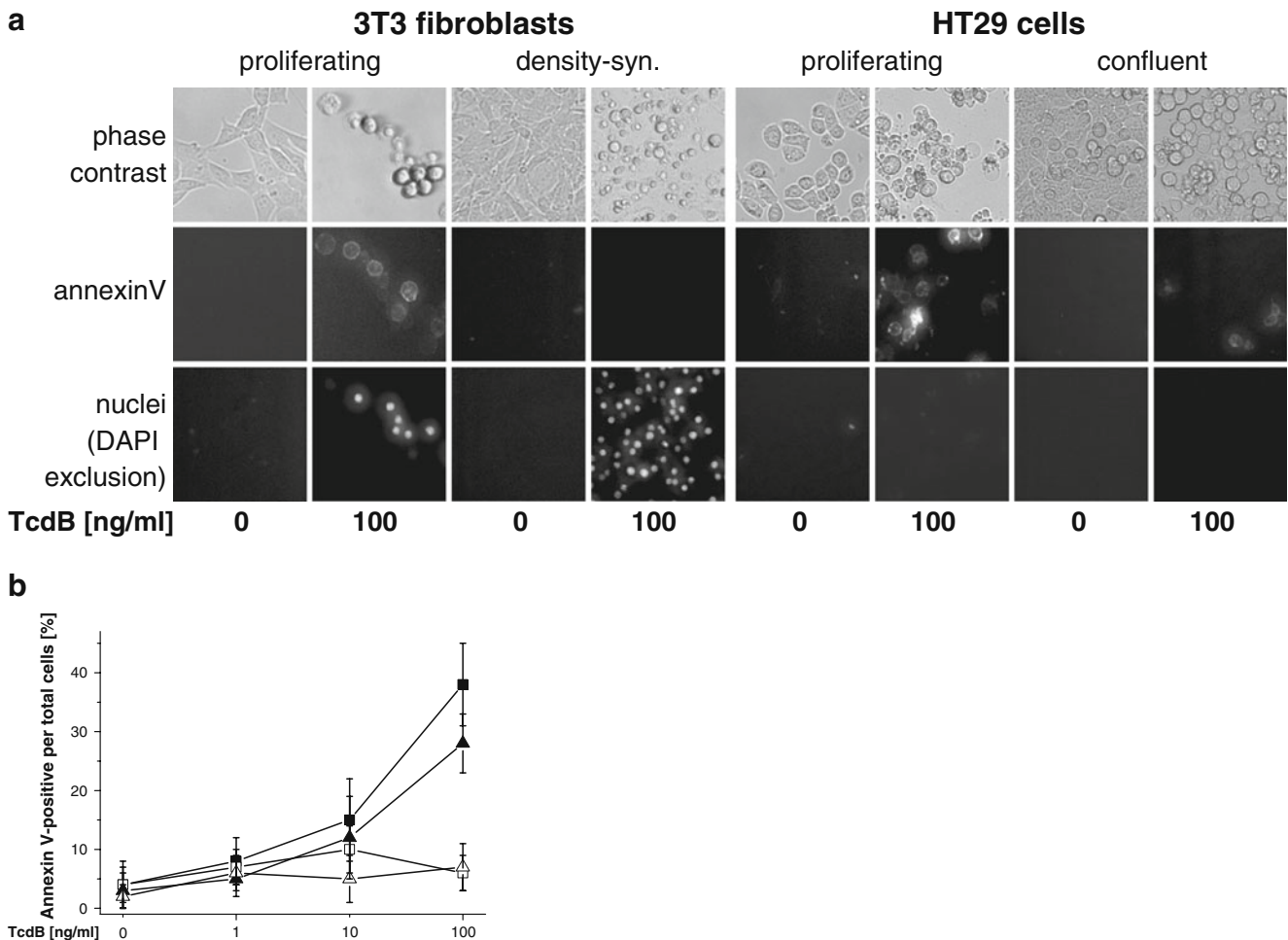


Fig. 7 Difference in the cytotoxic effects of TcdB in proliferating and non-proliferating cells. Proliferating fibroblasts (*filled squares*), density-synchronized fibroblasts (*empty squares*), proliferating HT29 cells (*filled triangles*), or confluent HT29 cells (*empty triangles*) were treated with the indicated concentrations of TcdB or buffer for 24 h. **a**

Cell morphology was analyzed using phase-contrast microscopy. Phosphatidylserine exposure was visualized by annexin V staining. Membrane integrity was analyzed in terms of DAPI exclusion. **b** The cytotoxic effect was quantified as the number of annexin-V-positive per total cells in percent

in confluent G0/1 cells is likely different from apoptosis initiation in proliferating cells. In proliferating cells, apoptosis has been suggested to be based on the inhibition of Rho-dependent signaling critical for cell survival in S phase and the expression of the proapoptotic protein RhoB (Huelsenbeck et al. 2007a, b). In contrast, in confluent cells, apoptosis may result from prolonged cell cycle arrest (Vermeulen et al. 2003). This view is supported by a report suggesting that TcdB stimulates not only a single but multiple apoptotic pathways in cells (Qa'Dan et al. 2002).

While there are many reports on TcdA-/TcdB-induced apoptosis (Brito et al. 2002; Hippenstiel et al. 2002; Huelsenbeck et al. 2007b; Matarrese et al. 2007), TcdA-/TcdB-induced necrosis has been much less intensively investigated (Solomon et al. 2005; Warny et al. 2000). With respect to the pathology of the CDAD, one must hypothesize that necrosis is more important in the pathogenesis of

the CDAD than apoptosis based on two considerations: (1) CDAD is characterized by necrosis of the colonic mucosa and the formation of pseudomembranes that consist of dead cells kept in a fibrin matrix (Genth et al. 2008) and (2) mucosal colonocytes are terminally differentiated, i.e., they are more resistant to apoptosis (compared with proliferating cells) due to the expression of apoptosis suppressor proteins (Lowe et al. 2004). Against that background, it appears paradox why most researchers refer to TcdB-induced apoptosis but not to necrosis. One reason might be the lack of a positive definition of necrosis that has formerly been mostly defined in a negative manner as cell death lacking the characteristics of apoptosis (Golstein and Kroemer 2007). Nowadays, a molecular definition of necrotic cell death is available (Galluzzi et al. 2009). A detailed analysis of TcdB-induced necrosis is in progress in our laboratory.

The renewal of the colonic epithelium depends on stem cells that are housed in the base of the colonic crypts (Humphries and Wright 2008). Stem cells feed the transit-amplifying compartment, where most cell production occurs. This portion of the crypt is thought to also house the committed progenitor cells, cells that are committed to develop into terminally differentiated colonocytes. *C. difficile* colonizes the colon as well as the crypts, where it reproduces and releases TcdA and TcdB (Sunenshine and McDonald 2006). It is thus conceivable that TcdA and TcdB act on the compartment of transit-amplifying cells in the crypts. The toxins may inhibit proliferation (or even induce apoptosis at higher toxin concentrations) in this compartment of rapidly proliferating cells. Subsequently, the renewal of the colonic epithelium is most likely reduced. The connection between inhibition of epithelial renewal and the development of diarrhea is well established in cancer chemotherapy, as diarrhea represents an often-reported unwanted side effect of many anticancer drugs (which suppress proliferation). The inhibition of epithelial renewal likely represents a not yet investigated aspect in the pathogenesis of CDAD.

Acknowledgements This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (priority program 1150 grant GE 1247/1-3).

References

- Aktorics K, Just I (2005) Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 291:113–145
- Brito GA, Fujji J, Carneiro-Filho BA, Lima AA, Obrig T, Guerrant RL (2002) Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. *J Infect Dis* 186:1438–1447
- Fiorentini C, Fabbri A, Falzano L, Fattorossi A, Matarrese P, Rivabene R, Donelli G (1998) *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infect Immun* 66:2660–2665
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16:1093–1107
- Genth H, Aktories K, Just I (1999) Monoglucosylation of RhoA at threonine-37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem* 274:29050–29056
- Genth H, Selzer J, Busch C, Dumbach J, Hofmann F, Aktories K, Just I (2000) New method to generate enzymatically deficient *Clostridium difficile* toxin B as an antigen for immunization. *Infect Immun* 68:1094–1101
- Genth H, Huelsenbeck J, Hartmann B, Hofmann F, Just I, Gerhard R (2006) Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B. *FEBS Lett* 580:3565–3569
- Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I (2008) *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 40:592–597
- Golstein P, Kroemer G (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32:37–43
- Halabi-Cabezon I, Huelsenbeck J, May M, Ladwein M, Rottner K, Just I, Genth H (2008) Prevention of the cytopathic effect induced by *Clostridium difficile* toxin B by active Rac1. *FEBS Lett* 582:3751–3756
- Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD, Seybold J, Krüll M, Preissner K, Von Eichel-Streiber C, Suttrop N (2002) Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L830–L838
- Huelsenbeck J, Dreger S, Gerhard R, Barth H, Just I, Genth H (2007a) Difference in the cytotoxic effects of toxin B from *Clostridium difficile* strain VPI 10463 and toxin B from variant *Clostridium difficile* strain 1470. *Infect Immun* 75:801–809
- Huelsenbeck J, Dreger SC, Gerhard R, Fritz G, Just I, Genth H (2007b) Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry* 46:4923–4931
- Huelsenbeck SC, May M, Schmidt G, Genth H (2009) Inhibition of cytokinesis by *Clostridium difficile* toxin B and cytotoxic necrotizing factors—reinforcing the critical role of RhoA in cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:967–975
- Humphries A, Wright NA (2008) Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 8:415–424
- Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, LaMont JT (2007) Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. *Gastroenterology* 133:875–886
- Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP (2010) The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467:711–713
- Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307–315
- Mahida YR, Makh S, Hyde S, Gray T, Borriello SP (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* 38:337–347
- Matarrese P, Falzano L, Fabbri A, Gambardella L, Frank C, Geny B, Popoff MR, Malorni W, Fiorentini C (2007) *Clostridium difficile* toxin B causes apoptosis in epithelial cells by thrilling mitochondria. Involvement of ATP-sensitive mitochondrial potassium channels. *J Biol Chem* 282:9029–9041
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140:627–636
- Nottrott S, Schoentaube J, Genth H, Just I, Gerhard R (2007) *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. *Apoptosis* 12:1443–1453
- QáDan M, Ramsey M, Daniel J, Spyres LM, Safiejko-Mroccka B, Ortiz-Leduc W, Ballard JD (2002) *Clostridium difficile* toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cell Microbiol* 4:425–434
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K (1998) Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins—effects on

- nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. *Biochemistry* 37:5296–5304
- Solomon K, Webb J, Ali N, Robins RA, Mahida YR (2005) Monocytes are highly sensitive to *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Infect Immun* 73:1625–1634
- Sunenshine RH, McDonald LC (2006) *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve Clin J Med* 73:187–197
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif* 36:165–175
- Voth DE, Ballard J (2005) *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 18:247–263
- Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP (2000) p38MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocytes necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Investig* 105:1147–1156
- Wilde C, Vogelsang M, Aktories K (2003) Rho-specific *Bacillus cereus* ADP-ribosyltransferase C3cer cloning and characterization. *Biochemistry* 42:9694–9702

2. Zusammenfassung

2.1 Einleitung

2.1.1 *C. difficile*-assoziierte Diarrhoe

Prolongierte Antibiotikabehandlungen, besonders mit Ampicillin, Cephalosporinen, Clindamycin und Fluoroquinolonen, bewirken die Zerstörung der physiologischen bakteriellen Darmflora und ermöglichen eine Überwucherung des Darms mit *Clostridium difficile* (Voth & Ballard, 2005). *C. difficile* produziert Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB). TcdA und TcdB sind die Auslöser der Antibiotika assoziierten Diarrhoe, die sich in ihren schweren Verlaufsformen zur pseudomembranösen Kolitis (PMC) und zum toxischen Megakolon entwickeln kann (Bartlett et al., 2002; Voth & Ballard, 2005). Die PMC ist durch die Bildung von vulkanartigen weißen Plaques in der Darmwand charakterisiert. Diese „Pseudomembranen“ bestehen aus toten Zellen, die in einer Fibrinmatrix gehalten werden (Just et al., 2000) (Abb. 1). Die Therapie der *C. difficile*-assoziierten Diarrhoe (CDAD) erfolgt mit Metronidazol oder Vancomycin und führt bei Ansprechen nach drei bis fünf Tagen zum Sistieren der Symptome. Eine Zulassung für das ebenfalls wirksame Rifaximin steht in Deutschland noch aus (Kokkotou et al., 2008).



Abb. 1 Endoskopisches Bild einer Pseudomembranösen Kolitis mit den typischen vulkanartigen, fibrinhaltigen Plaques (Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chefarzt Dr. A. Meister, Gastroenterologie, Vinzenzkrankenhaus, Hannover).

2.1.2 Clostridiale glucosylierende Toxine

Neben TcdA und TcdB gehören das Letale Toxin (TcsL) und das Hämorrhagische Toxin (TcsH) von *C. sordellii* und das α -Toxin von *C. novyi* zu der Familie der clostridialen glukosylierenden Toxine (**Aktories & Just, 2005**). Deren einsträngige Proteintoxine besitzen eine AB-ähnliche Struktur mit einer N-terminal gelegenen katalytischen Domäne, der Glykosyltransferasedomäne (GTD), und einer C-terminalen Transportdomäne (**Genth et al., 2008**) (**Abb. 2**). Die C-terminale Transportdomäne gliedert sich in:

1. eine, aus repetitiven Oligopeptidsequenzen aufgebaute Rezeptorbindungsdomäne (RBD),
2. eine, aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Transmembrandomäne (TMD), die vermutlich eine Pore in der Endosomenmembran bildet, durch welche die GTD ins Zytosol transloziert sowie
3. eine Cysteinproteasedomäne (CPD), durch welche die GTD von der Transportdomäne abgespalten wird.

Die abgelöste Glykosyltransferasedomäne befindet sich nun im Zytosol der Zelle und glucosyliert – abhängig von Mn^{2+} und der ubiquitär vorkommenden UDP-Glucose – niedermolekulare GTP-bindende Proteine der Rho- und der Ras-Familien. Durch die Glucosylierung werden die Proteine inaktiviert und damit die Signalweitergabe blockiert (**Jaffe & Hall, 2005**) (**Abb. 3**).

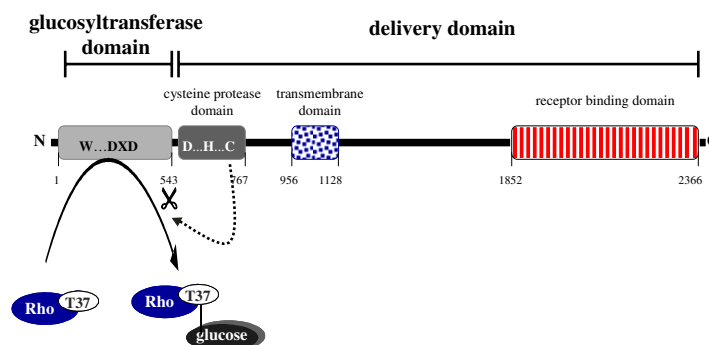


Abb. 2 Schematische Darstellung des Aufbaus von TcdB
C-Terminal findet sich die Transportdomäne, bestehend aus der Rezeptorbindedomäne (RBD), der Transmembrandomäne (TMD) und der Cysteinproteasedomäne (CPD). Die N-terminale Glykosyltransferasedomäne ist verantwortlich für die Glucosylierung der Rho-GTPasen im Zytosol (**Abbildung aus Genth et al., 2008**).

2.1.3 Funktionelle Auswirkungen der Hemmung niedermolekularer GTP-bindender Proteine der Rho-Familie durch *C. difficile* Toxine

Rho-GTPasen bestimmen essentielle Zellfunktionen, wie die Regulation des Aktinzytoskeletts und den Erhalt der Zellmorphologie, der Motilität, der Zell-Zell-Kontakte sowie die Ausbildung des kontraktiven Rings in der Zytokinese. Insbesondere reguliert RhoA die Bildung von Aktinstressfasern, Rac1 die Bildung von Lamellipodien sowie Cdc42 die Bildung der Filopodien.

TcdA und TcdB glucosylieren und inaktivieren damit die Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42. In kultivierten Zellreihen bewirken TcdA und TcdB daher einen Verlust der Aktinstressfasern (damit verbunden eine fehlende Bildung des kontraktiven Rings), der Lamellopodien, der Filopodien sowie der fokalen Anheftungskomplexe („zytotoxische Effekte“). TcdA-/TcdB-behandelte Zellen sind daher abgerundet. Werden Zellen über lange Zeiträume bzw. mit hohen Toxinkonzentrationen behandelt, wird der Zelltod beobachtet. TcdA und TcdB induzieren sowohl Aspekte des apoptotischen als auch des nekrotischen Zelltodes („zytotoxische Effekte“).

2.1.4 Regeneration des Kolonepithels

Als eines der sich am schnellsten regenerierenden Gewebe im menschlichen Körper unterliegt der Darm einer stetigen Erneuerung zugrunde gegangener Zellen. Die Zellerneuerung beginnt in den Kryptentiefen, in denen die pluripotenten Stammzellen lokalisiert sind. Die pluripotenten Stammzellen teilen sich asymmetrisch in neue Stammzellen und schnell proliferierende Vorläuferzellen („Transit amplifying cells“). Diese Vorläuferzellen können sich in alle drei Zellarten der Schleimhaut differenzieren: In terminal differenzierte Enterozyten, in schleimbildende Becherzellen oder in enteroendokrinen Zellen. (Abb.3)(Humphries & Wright, 2008).

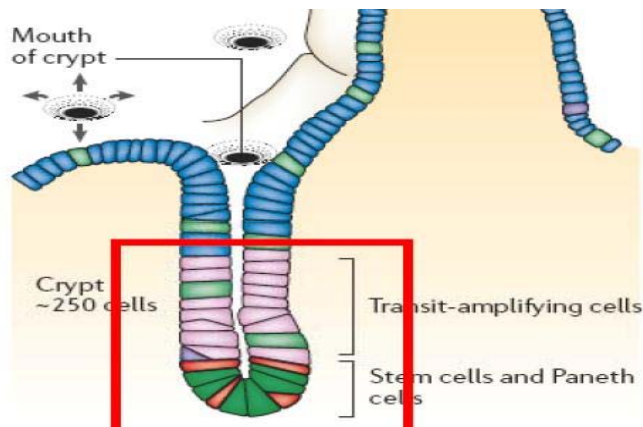


Abb. 3 Darmkryptenaufbau

Die, in der Tiefe der Krypten gelegenen, Stammzellen sind für die Regeneration des Kolonepithels verantwortlich. Die „transit amplifying“ Zellen sind Vorläuferzellen mit einer hohen Proliferationsrate (Abbildung aus Humphries & Wright, 2008).

2.1.5 Apoptose und Nekrose

1. Apoptose

Apoptose ist zumeist ein physiologischer Vorgang und essentieller Bestandteil der Entwicklung und des Erhalts des menschlichen Organismus (z.B. Keimzellregeneration). Apoptotischer Zelltod ist ein, einem Ablaufprogramm unterliegender, energieverbrauchender Vorgang und setzt somit einen intakten Stoffwechsel voraus. Apoptose tritt aber auch in pathologischen Zusammenhängen auf. So werden neurodegenerative Erkrankungen oder degenerative Erkrankungen der Leber mit unkontrollierter (überschießender) Apoptose in Verbindung gebracht (Sola et al., 2007).

Die Apoptose wird entweder durch externe Faktoren (wie z.B. den Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) initiiert oder durch interne Signalen (z.B. Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien) ausgelöst. In der Exekutionsphase der Apoptose werden die DNA durch DNAsen und die Strukturproteine (wie z.B. Laminin und Aktin) durch Cysteinproteasen (sogenannten Caspasen) proteolytisch abgebaut. Die proteolytisch abgebauten Zellbestandteile schnüren sich als Vesikel von der Zellmembran ab und werden von Phagozyten aufgenommen (Cohen, 1997; Adams, 2003; Kroemer et al., 2009).

Morphologische Charakteristika der Apoptoseexekution sind:

1. Zellabrundung und Verlust der Pseudopodia,
2. Zellschrumpfung (Pyknose),
3. DNA-Abbau (Karyorrhexie),
4. Abbau von Zellorganellen,
5. Plasmamembranabschnürung (Vesikelbildung),
6. Phagozytose durch Phagozyten,
7. Phosphatidylserinexternalisierung.

Apoptotischer Zelltod ist zumeist nicht von einem Entzündungsgeschehen begleitet.

2. Nekrose

Die Nekrose beschreibt einen energieunabhängigen Zelluntergang, der oftmals durch externe Stimuli, wie mechanische Einwirkung, Gifte und Nährstoff- oder Sauerstoffmangel, ausgelöst wird. Ursprünglich wurde Nekrose als unkontrollierter Zelltod angesehen. Inzwischen ist klar, dass auch dem nekrotischen Zelltod ein Ablaufplan zugrunde liegt und in diesen spezifische Regulatorproteine (wie die Serin/Threonin-Kinase RIP1) involviert sind (**Goldstein & Kroemer, 2007; Kroemer et al. 2009**). Im Verlauf der Nekroseexekution kommt es zu einer Störung der Zellionenpumpen und somit zu einer Disbalance der Ionenströme, die in einem intrazellulären Anstieg der Natrium- und Kalium-Ionen resultiert. Der folgende osmotische Wassereinfluss in die Zelle führt zum Anschwellen bzw. zur Ruptur der Zelle.

Die Charakteristika der Nekrose sind (**Kroemer et al., 2009**):

1. Zellschwellung (Oncoese) und Schwellung der Zellorganellen,
2. mäßige Chromatinkondensation,
3. Zellmembranruptur.

Infolge der Ruptur der Zellmembran kommt es zum Austreten von Zellinhalt. Dies lockt Immunzellen an und eine lokale Entzündungsreaktion entsteht.

2.2 Zielsetzung

In einer vorherigen Arbeit zeigte das Genth Labor, dass S-Phase Zellen bzw. Zellen, die die S-Phase passieren, besonders empfindlich gegenüber der durch TcdB induzierten Apoptose sind (**Huelsenbeck, 2007a; Huelsenbeck, 2007b**). Im Umkehrschluss sollten Zellpopulationen, die keine S-Phase Passage (wie z.B. dichtesynchronisierte Zellen in der G1/G0 Phase) zeigen, insensitiv gegenüber der durch TcdB induzierten Apoptose sein und möglicherweise Aspekte des nekrotischen Zelltodes aufweisen.

Diese Arbeit untersucht nun, inwieweit die Zellzyklusprogression den Modus, des durch TcdB induzierten Zelltodes, bestimmt. Hierzu werden als Endpunkte für die zytopathischen Effekte die Zellabrundung und die Bildung zweikerniger Zellen untersucht; die zytotoxischen Effekte werden anhand des Verlustes der Membranheterogenität (Externalisierung von Phosphatidylserin), des Verlustes der Membranintegrität, der DNA-Fragmentierung (Auftreten der sub-G1 Population im FACS) sowie der Reduktion der Viabilität (WST-1 Test) untersucht.

Als Zellkulturmodelle dienen dichtesynchronisierte NIH3T3 Fibroblasten und konfluente HT29 Zellen als Modelle für nicht-proliferierende Zellpopulationen und subkonfluente Fibroblasten und HT29 Zellen als Modelle für proliferierende Zellpopulationen.

2.3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte von TcdB vergleichend in proliferierenden Zellen (subkonfluente NIH3T3 Fibroblasten und HT29 Zellen) und nicht-proliferierenden Zellen (dichtesynchronisierte NIH3T3 Fibroblasten und konfluente HT29 Zellen) untersucht. Die erfolgreiche Dichtesynchronisation der NIH3T3 Fibroblasten wurde mittels FACS-Analyse Propidiumiodid angefärbter Zellen (**Lica et al., Abb. 2**) sowie der fehlenden Zunahme an Zellviabilität (WST-1 Test) nachgewiesen (**Lica et al., Abb. 3**).

Eine konfluente Population von HT29 Zellen wächst überlappend weiter; konfluente HT29 Zellen ließen sich daher nicht vollständig synchronisieren (**Lica et al., Abb. 3**).

Die Behandlung von NIH3T3 Fibroblasten und HT29 Zellen mit TcdB bewirkte eine Zellabrundung (**Lica et al., Abb. 1a**). Bei TcdB Konzentrationen ≥ 1 ng/ml waren sowohl die Kinetik der Zellabrundung (**Lica et al., Abb. 1b**) als auch die der Glucosylierung von Rho (**Lica et al., Abb. 4**) in proliferierenden und nicht-proliferierenden Fibroblasten vergleichbar, d.h. unabhängig von Zelldichte und Zellproliferation.

Die Rho-Glukosylierung durch TcdB blockiert die Bildung des kontraktilen Ringes in der Zytokinese, interferiert aber nicht mit der Karyokinese. TcdB behandelte Zellen zeigen daher Zweikernigkeit (**Huelsenbeck et al., 2009**). Die Behandlung proliferierender Fibroblasten und HT29-Zellen mit TcdB bewirkte daher eine ausgeprägte Bildung zweikerniger Zellen (**Lica et al., Abb. 1b, Abb. 5**). Dieser Effekt war in nicht-proliferierenden Populationen von Fibroblasten und HT29 Zellen aufgrund der fehlenden oder reduzierten Passage durch die M-Phase deutlich reduziert (**Lica et al., Abb. 1b, Abb. 5**).

Bei Behandlung mit einer zytotoxischen Konzentration von TcdB (100 ng/ml) nahm die Zweikernigkeit deutlich ab (**Lica et al., Abb. 1b, Abb. 5**). Stattdessen wurde der Zelltod beobachtet (**Lica et al., Abb. 6, Abb. 7**). So zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit TcdB und anschließender Annexin-V-Färbung 40% der proliferierenden Fibroblasten (30% der HT29 Zellen) eine Phosphatidylserinexternalisierung (**Lica et al., Abb. 7a, Abb. 7b**) und DNA Fragmentierung (**Lica et al., Abb. 6**). Zusätzlich zeigte sich in den Fibroblasten ein Verlust der Membranintegrität, die in einer stärkeren Anfärbung der DNA mittels DAPI resultierte (**Lica et al., Abb. 7a**). Das Auftreten sowohl apoptotischer (Phosphatidylserinexternalisierung) als auch nekrotischer (Verlust der Membranintegrität) Charakteristika in der Fibroblastenpopulation deutet darauf hin, dass in Fibroblasten durch die TcdB Einwirkung späte Apoptose induziert wurde.

Eine Annexin-V-Anfärbung gelang in den nicht-proliferierenden Fibroblasten

nicht und war in den konfluierenden HT29 Kolonozyten nur schwach ausgeprägt (**Lica et al., Abb. 7a, Abb. 7b**). Die Beobachtung, dass der Apoptosemarker Phosphatidylserinexternalisierung nur in proliferierenden Zellen auftrat, ließ den Schluss zu, dass Apoptose von der Zellproliferation, d.h. von der Zellzyklusprogression, abhängt.

In nicht-proliferierenden Fibroblasten verursachte die zytotoxische TcdB Konzentration (100ng/ml) ein nekrotisches Absterben der Population, welches sich in einem kompletten Verlust der Zellmembranintegrität (**Lica et al., Abb. 7a**), einer Reduktion der Viabilität (**Lica et al., Abb. 3**) und der ausbleibenden Phosphatidylserinexternalisierung widerspiegelte (**Lica et al., Abb. 7a, Abb. 7b**). TcdB bewirkte auch in konfluenten HT29 Zellen eine deutliche Reduktion der Zellviabilität (**Lica et al., Abb. 3**), nicht aber einen Verlust der Membranintegrität (**Lica et al., Abb. 7a**). In den proliferierenden Fibroblasten und HT29 Zellen hingegen blieb ein Viabilitätsabfall aus (**Lica et al., Abb. 3**). Der Erhalt der Zellviabilität ist ein Kennzeichen apoptotischen Zelltodes, während der Abfall der Viabilität ein Kennzeichen der Nekrose darstellt.

Zusammenfassend legen diese Beobachtungen nahe, dass TcdB in proliferierenden Zellpopulationen einen apoptotischen im Gegensatz dazu aber in nicht-proliferierenden Zellpopulationen einen nekrotischen Zelltod induziert.

2.4 Diskussion

Während TcdB in proliferierenden Fibroblasten und HT29 Zellen, d.h. in Zellenpopulationen mit S-Phase Passage, apoptotischen Zelltod auslöste, wurde dies in nicht-proliferierenden / dichtesynchronisierten Zellen nicht beobachtet (**Lica et al., Abb. 3**). Die fehlende Auslösung der Apoptose in nicht-proliferierenden / dichtesynchronisierten Zellen bedeutet jedoch nicht, dass diese Zellen vor TcdB induziertem Zelltod geschützt sind. Eine auffällige Abnahme der Viabilität legt nahe, dass TcdB in nicht-proliferierenden Zellen nekrotischen Zelltod auslöst (**Lica et al., Abb. 7a**). Diese Beobachtungen implizieren, dass der Modus des Zelltodes, der durch TcdB ausgelöst wird, von

der Zellzyklusprogression zumindest mitbestimmt wird.

Unsere Beobachtung, dass konfluente Epithelzellen eine geringere Sensibilität gegenüber einer TcdA/TcdB induzierten Apoptose als proliferierende Zellen besitzen, stimmt mit einem früheren Bericht überein (**Fiorentini et al., 1998**). Zahlreiche Forschergruppen verwendeten dennoch konfluente Kolonozyten als Zellkulturmodelle, um die Effekte der *C. difficile* Toxine zu erforschen. Die (relative) Resistenz der konfluenten Zellen gegen die Apoptose haben die Autoren entweder durch längere Inkubationszeiten (48 Stunden) oder den Einsatz höherer Toxinkonzentrationen überwunden (**Fiorentini et al., 1998; Mahida et al., 1996; Nottrott et al., 2007**). Vermutlich unterscheiden sich jedoch die Signalwege, die in nicht-proliferierenden Zellen (aus dem G1-Arrest) und in proliferierenden Zellen (abhängig von S-Phase Passage) zur Apoptose führen (**Huelsenbeck et al., 2007a, b; Vermeulen et al., 2003; Qa`Dan et al., 2002**).

Die schwere Verlaufsform der CDAD, die pseudomembranöse Kolitis, ist durch gelbe Plaques gekennzeichnet, die aus toten Zellen (Kolonozyten und neutrophilen Granulozyten) in einem Fibrinfasergeflecht bestehen (**Lowe et al., 2004; Genth et al., 2008**). Das Auftreten dieses Zelldetritus deutet auf nekrotischen Zelltod hin. Nimmt man nicht-proliferierende Zellen als Modell für terminal differenzierte Zellen, so korreliert das Auftreten des nekrotischen Zelldetritus in der PMC mit unserer Beobachtung aus dem Zellkultursystem, dass in nicht-proliferierenden Zellen eher nekrotischer als apoptotischer Zelltod auftritt. Apoptose supprimierte Proteine, die verstärkt in terminal differenzierten Zellen exprimiert werden, könnten für die Apoptoseunterdrückung und damit indirekt für die Nekroseauslösung verantwortlich sein. Die meisten Forscher, die TcdB induzierten Zelltod untersuchten, konzentrierten sich auf die durch TcdB induzierte Apoptose. Aus der Pathologie der PMC sowie den Ergebnissen dieser Studie folgt, dass die durch TcdB induzierte Nekrose in der Pathogenese der *Clostridium difficile*-assoziierten Diarrhoe (CDAD) vermutlich eine wichtige, wenn nicht die bestimmende Rolle spielt.

Einem zweiten Aspekt der Wirkungen der *C. difficile* Toxine, nämlich dem, dass die Toxine die Proliferation hemmen, wurde bisher wenig Beachtung geschenkt. Die Erneuerung des Kolonepithels hängt von schnell proliferierenden Vorläuferzellen, den „transit amplifying“ (TA) Zellen, ab (**Abb. 3**). Bereits in relativ niedrigen Konzentrationen bewirkt TcdB in diesen Zellen einen Proliferationsstopp. In höheren Konzentrationen könnte TcdB auch Apoptose in diesen Zellpopulationen auslösen. Dieser Mechanismus würde die Erneuerung des Kolonepithels blockieren und somit die Vulnerabilität der Darmmukosa zusätzlich verstärken. Dass proliferationshemmende oder zytotoxische Agentien die Kolonerneuerung blockieren und dadurch Diarrhoen auslösen, ist eine bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkung anti-neoplastischer Chemotherapeutika (**Aktories et al., 2008**). Somit stellt die Hemmung der Erneuerung des Kolonepithels vermutlich einen weiteren wichtigen Aspekt der Pathogenese der CDAD dar.

2.5 Literaturverzeichnis

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., Starke, K.. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban & Fischer Verlag*, 10 Auflage, 2009

Aktories, K., Just, I.. Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 291:113-145, 2005

Adams, J. M.. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development* 17(20): 2481-2495, 2003

Bartlett, J. G.. Antibiotica associated diarrhea. *New England Journal of Medicine* 346 (5):334-339, 2002

Cohen, G.M.. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 15;326(Pt 1):1-16, 1997

Fiorentini C., Fabbri A., Falzano L., Fattorossi A., Matarrese P., Rivabene R., Donelli G.. *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infection and Immunity* 66(6):2660–2665, 1998

Genth, H., Dreger, S. C., Huelsenbeck, J., Just, I.. *Clostridium difficile* toxins: More than mere inhibitors of Rho proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(4):592-597, 2008

Golstein P., Kroemer G.. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Science* 32(1):37–43, 2007

Huelsenbeck, J., Dreger, S., Gerhard, R., Barth, H., Just, I., Genth, H.. Difference in the Cytotoxic Effects of toxin B from *Clostridium difficile* Strain VPI 10463 and Toxin B from variant *Clostridium difficile* Strain 1470. *Infection and Immunity* 75(2):801-809, 2007a

Huelsenbeck, J., Dreger, S. C., Gerhard, R., Fritz, G., Just, I., Genth, H.. Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry* 46(16):4923-4931, 2007b

Huelsenbeck, S. C., May, M., Schmidt, G., Genth, H.. Inhibition of cytokinesis by *Clostridium difficile* toxin B and cytotoxic necrotizing factors reinforcing the critical role of RhoA in cytokinesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66(11):967-975, 2009

Humphries, A., Wright, N. A.. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Review Cancer* 8(6):415-424, 2008

Jaffe, A. B., Hall, A.. Rho GTPases: Biochemistry an biology. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 21:247-269, 2005

Just, I., Hofmann, F., Aktories, K.. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Current Topics Microbiology Immunology* 250:55-83, 2000

Kokkotou, E., Moss, A. C., Michos, A., Espinoza, D., Cloud, J. W., Mustafa, N., O'Brien, M., Pothoulakis, C., Kelly, C. P.. Comparative efficacies of Rifaximin and Vancomycin for treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and prevention of disease recurrence in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(3):1121-1126, 2008

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.. S., Baehrecke, E.. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16(1):3–11, 2009

Lowe, S. W., Cepero, E., Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 18;432(7015):307-15, 2004

Mahida, Y. R., Makh, S., Hyde, S., Gray, T., Borriello, S. P.. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut* 38(3):337–347, 1996

Nottrott, S., Schoentaube, J., Genth, H., Just, I., Gerhard, R.. *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. *Apoptosis*, 12(8):1443-1453, 2007

QáDan, M., Ramsey, M., Daniel, J., Spyres, L. M., Safiejko-Mrocza, B., Ortiz-Leduc, W., Ballard, J. D.. *Clostridium difficile* toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cellular Microbiology* 4(7):425–434, 2002

Sola, S., Aranha, M. M., Steer, C. J., Rodrigues, C. M.. Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Current Issues in Molecular Biology* 9, 123-138, 2007

Vermeulen, K., Berneman, Z. N., Van Bockstaele, D. R.. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation* 36(3):165–175, 2003

Voth, D. E., Ballard, J. D.. *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews* 18(2):247-263, 2005

4. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. *Harald Genth* für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu dürfen bedanken. Er hat mich hervorragend durch alle Prozesse meiner Arbeit begleitet, war jeder Zeit mit Rat und Tat an meiner Seite und hat mit seiner netten Art immer wieder beruhigend auf mich eingewirkt. Ich habe mich während der gesamten Zeit sehr gut und sicher betreut gefühlt. Dafür danke ich ihm von Herzen.

Auch *Florian Schulz*, der mich gewissenhaft in die Laborarbeit eingeführt und mich geduldig bei meiner Arbeit unterstützt hat, danke ich sehr. Ohne ihn hätten sicher noch mehr unschuldige Zellen im flüssigen Stickstoff ihr Leben lassen müssen. *Ilona Schelle* und *Martin May* bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet für ihre nette Hilfe und die viele Zeit, die sie mir geschenkt haben. Ich bedanke mich bei dem ganzen Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. I. Just für ihre hilfreichen Anmerkungen und die nette Zusammenarbeit.

Überdies danke ich meinen wundervollen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums großzügig finanziell unterstützt haben und mir durch Ihre Liebe und emotionale Unterstützung das Studium sehr erleichtert haben. Ohne ihren Glauben in mich, das viele Vertrauen in meine Fähigkeiten und ihre Liebe, wäre ich sicher niemals soweit gekommen. Ich danke euch unendlich für Alles, was ihr mir ermöglicht habt. Ich liebe euch sehr!

Meiner liebsten Freundin *Kristina Pallasch*, danke ich für die viele Geduld in dieser Zeit, die zahlreichen aufbauenden Gespräche und einfach dafür, dass sie so eine fabelhafte Freundin ist.

Tobias Klemeier danke ich für die liebevolle Unterstützung während des finalen Schreibprozesses.

5. Eidesstattliche Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 / 7

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Unterschiede in der biologischen Wirkung des *Clostridium difficile* Toxin B in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen“ im Institut für Toxikologie unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Harald Genth durchgeführt habe und bei der Abfassung der Dissertation keine andern als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

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

Die Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Lica, M., Schulz, F., Schelle, I., May, M., Just, I., Genth, H.. Difference in the biological effects of *Clostridium difficile* toxin B in proliferating and non-proliferating cells. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 383(3), 275-283, 2011

Hannover, den 25. Februar 2011

(Unterschrift)