

Darstellung und Charakterisierung
von rekombinantem
***Clostridium difficile* Toxin A**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Silke Burger
geboren am 05.08.1974 in Kiel

Angefertigt im
Institut für Toxikologie
der Medizinischen Hochschule
Hannover
2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2001 bis Oktober 2004 im Labor von Herrn Prof. Dr. Ingo Just im Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof Dr. Ingo Just

Tag der Promotion: 08.12.2004

Schlagworte:

Bacillus megaterium, Rho-GTPasen, Cytochrom C-Freisetzung

Bacillus megaterium, Rho-GTPases, cytochrome C release

ZUSAMMENFASSUNG

Clostridium difficile, ein anaerobes, sporenbildendes Bakterium, verursacht die pseudomembranöse Colitis, eine schwere Entzündung der Darmschleimhaut. Das Bakterium bildet im vegetativen Zustand zwei einkettige Exotoxine, Toxin A und Toxin B. Diese gehören zur Gruppe der großen clostridialen Zytotoxine, die ihre eukaryontischen Zielmoleküle durch Glucosylierung modifizieren.

Derzeit wird das *C. difficile* Toxin A aus Kulturüberständen gefällt und über Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Affinitätsreinigung angereichert. Diese Anreicherung gewährleistet keinen Ausschluss von Toxin-assoziierten Faktoren, die sich bei der Untersuchung der Toxinwirkung störend auswirken können.

In der vorliegenden Arbeit wird die erfolgreiche Generierung des rekombinanten Toxin A durch folgende Aspekte beschrieben:

- Klonierung und Histidinmarkierung des Toxin A-Gens
- Etablierung der Expression in *Bacillus megaterium* und Nickel-Affinitätsreinigung
- Überprüfung der biologischen Wirkung des Toxins anhand der Cytotoxizität, der Enzymaktivität und einer direkten mitochondrienschädigenden Wirkung.

Die Charakterisierung ergab, dass das rekombinante Toxin A in der biologischen Wirkung mindestens gleichwertig dem konventionell gereinigten Toxin ist; eine leicht erhöhte Zytotoxizität und Glucosyltransferaseaktivität des rekombinanten Toxins lässt sich durch die schonendere einstufige Aufreinigung erklären. Es konnte im Cytochrom C-Freisetzungsnachweis gezeigt werden, dass ein dem Toxin zugeschriebener mitochondrienschädigender Effekt auf clostridiale Verunreinigungen von kruden Toxinpräparationen beruht und somit keine direkte Toxinwirkung darstellt.

Die Aktivierung inflammatorischer Signalwege durch das Toxin wurde anhand der Aktivierung der stressaktivierten Proteinkinase p38 MAP-Kinase untersucht. Mit dem rekombinanten Toxin A konnte die Aktivierung der p38-MAPK in eukaryotischen Zielzellen als reiner Toxineffekt bestätigt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Aktivierung und die Einleitung der Apoptose durch das Toxin werden diskutiert.

ABSTRACT

Pathogenic strains of *Clostridium difficile* produce two single-strained protein toxins, toxin A and toxin B. These toxins are the major pathogenic factors and induce pseudomembranous colitis.

Conventional purification of *Clostridium difficile* toxin A is so far performed by ion exchange chromatography and by thyroglobulin affinity purification. These procedures do not exclude additional biologically active clostridial products. Only the generation of recombinant toxin guarantees exclusion of such factors and enables to assign mere toxin effects. The present study describes

- Cloning of the *C. difficile* toxin A gene to generate recombinant, histidin-tagged toxin A
- Expression of recombinant toxin A in *B. megaterium* and purification by Ni²⁺-affinity chromatography
- Characterisation of the biological activity of the toxin by immunological, cytotoxic, and glucosyltransferase assays and by investigation of a direct effect of the toxin on mitochondria, causing apoptosis.

Comparison of wild type toxin A with the recombinant toxin A showed that the recombinant toxin is more cytotoxic and has a higher glucosyltransferase activity than the native toxin. This can be explained by the time-saving procedure of recombinant toxin preparation which in contrast to the preparation of native toxin does not include a denaturation step.

The direct effect on mitochondria was tested by the release of cytochrome C *in vivo* and from isolated mitochondria. It could be proved that the toxin A effect on mitochondria correlates with the purity of toxin A preparations. A proteineous contamination in native toxin A preparations seems to be responsible for direct mitochondrial damage but not the toxin itself. Recombinant toxin A is a valuable tool to exclude contamination, particularly in focussing on the intrinsic toxin effects, like the activation of p38 MAP-kinase. It is discussed why the kinase is activated by the toxin although the main activators RhoA and Rac1 are inactivated by the toxin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Clostridium difficile</i>	1
1.2	Große clostridiale Zytotoxine.....	1
1.3	Die Toxine A und B	2
1.3.1	Aufbau der Toxine A und B	2
1.3.2	Zytotoxische Effekte der Toxine A und B	4
1.3.3	Proinflammatorische Wirkung	6
1.3.4	Mitochondrienschädigung bei Apoptose	6
1.4	Aufreinigung des clostridialen Toxin A	7
1.5	Expression von rekombinantem Toxin A und B	7
1.6	Das <i>Bacillus megaterium</i> -System	8
1.7	Zielsetzung	9
2	MATERIAL	10
2.1	Bakterienstämme	10
2.2	Zelllinien	10
2.3	Plasmide	10
2.4	Enzyme und Kits	12
2.5	Oligonukleotide	13
2.6	Restriktionsendonukleasen	14
2.7	Antikörper	14
2.8	Geräte	15
2.9	Chemikalien	16
2.10	Puffer und Lösungen	17
2.11	Standards	19

3	METHODEN	20
3.1	Mikrobiologische Methoden	20
3.1.1	Anzucht von <i>C. difficile</i> VPI 10463 zur Isolierung von Toxin A	20
3.1.2	Anzucht der <i>Escherichia coli</i> -Stämme	20
3.1.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
3.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	21
3.1.5	Transformation von <i>Bacillus megaterium</i>	21
3.2	Methoden zur DNA-Analyse und Plasmidkonstruktion	22
3.2.1	Reinigung und Konzentrierung von chromosomaler DNA	22
3.2.2	Plasmid-DNA-Aufreinigung	22
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	22
3.2.4	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	23
3.2.5	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese	23
3.2.6	Präparative DNA-Aufreinigung mittels Jet-Sorb-Gelextraktionskit	24
3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	24
3.2.8	TA-Cloning	24
3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	24
3.2.10	Kinasieren nach PCR-Amplifikation	25
3.2.11	Gerichtete Mutation	26
3.2.12	Polymerase-Kettenreaktion für Sequenzierung	27
3.3	Biochemische Arbeiten	28
3.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	28
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.3.3	Proteinfärbung im SDS-Gel	29
3.3.4	Western Blot	29
3.3.5	Immunoblot	30
3.3.6	Aufreinigung von Toxin A aus <i>C. difficile</i> Kulturüberstand	30
3.3.7	Expression und Aufreinigung von rek. Toxin A in <i>B. megaterium</i>	31
3.3.7.1	Affinitätsreinigung von Toxin A durch Thyreoglobulinbindung	31
3.3.7.2	Ni ²⁺ -Affinitätsreinigung von rek., 6x His-markiertem Toxin A	32
3.3.8	Umpufferung des Toxin A durch PD ₁₀ -Säulen	33

3.3.9	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .	33
3.3.10	Lysatherstellung von Zellkulturen	34
3.3.11	Nachweis der Glucosyltransferaseaktivität	34
3.3.12	Isolation aktiver Rho-GTPasen (Pull down)	35
3.4	Zellkulturtechniken	35
3.4.1	Zellkultur	35
3.4.2	Zytotoxizitätsnachweis	36
3.4.3	Isolierung von Mitochondrien	37
3.4.4	DAPI-Färbung	37
3.4.5	Rhodamin-Phalloidinfärbung des Aktinzytoskeletts	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Amplifikation des Toxin A-Gens	39
4.1.1	Aufreinigung der chromosomalen DNA von <i>C. difficile</i>	39
4.1.2	Amplifikation des Toxin A-Gens	39
4.1.3	Ligation der Toxin A-Gen-Fragmente in pCR2.1 TOPO	41
4.1.4	Ligation der Gen-Fragmente zum Toxin A-Gen	43
4.1.5	Ligation des Toxin A-Gens in den Vektor pWH1520	46
4.1.6	Herstellung eines histidinmarkierten Toxin A-Gens	47
4.2	Expression des Toxin A in <i>B. megaterium</i>	48
4.3	Dot Blot-Analyse	50
4.4	Zytotoxizität des Lysats von transformierten <i>B. megaterium</i>	51
4.5	Optimierung der Expressionsbedingungen	52
4.6	Aufreinigung des rekombinanten Toxin A	53
4.6.1	Aufreinigung durch Thyreoglobulinbindung	53
4.6.2	Ni ²⁺ -Affinitätsreinigung	54
4.7	Funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Toxin A	56
4.7.1	Zytotoxizität des gereinigten Toxin A mit His-Markierung.....	56
4.7.2	Glucosyltransferaseaktivität	58

4.8	Untersuchung der apoptotischen Wirkung des Toxin A auf Zellen	60
4.8.1	DAPI-Färbung der DNA in Toxin A-behandelten Zellen	60
4.8.2	Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien durch Toxin A	61
4.9	Aktivierung der p38 MAP-Kinase	64
4.9.1	Aktivitätsbestimmung von RhoA und Rac1	65
5	DISKUSSION	68
6	ANHANG	77
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	88
	VERÖFFENTLICHUNGEN	93

1 EINLEITUNG

1.1 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile wurde 1935 erstmals durch Hall und O`Toole als anaerobes, Gram-positives, sporenbildendes Bakterium beschrieben, das Bestandteil einer normalen Darmflora ist. Seitdem Antibiotika in der Medizin verstärkt eingesetzt werden, gilt *C. difficile* als humanpathogenes Bakterium, das Auslöser der Antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Colitis ist. Eine intakte Darmflora verhindert die Übersiedlung des Darms mit dem Keim, ist diese Flora jedoch durch Breitspektrumantibiotika geschädigt, kann es zur Besiedlung des Colons mit *C. difficile* kommen.

C. difficile produziert im vegetativen Stadium zwei einkettige Exotoxine, Toxin A und Toxin B. Die Toxine gelten als Pathogenitätsfaktoren, da die isolierten Toxine in der Lage sind, im Tiermodell das gleiche Krankheitsbild wie der Keim auszulösen (Just, 1998, Kelly et al., 1998). Die Toxine werden zur Gruppe der großen clostridialen Zytotoxine gezählt, die strukturell gleich aufgebaut sind und eukaryontische Zielmoleküle kovalent modifizieren. Die Symptomatik der Erkrankung variiert von der selbstlimitierenden Diarrhöe bis hin zur schweren entzündlichen pseudomembranösen Colitis. Eine *C. difficile*-Infektion ist bisher nur durch die Gabe der spezifischen Antibiotika Metronidazol oder Vancomycin therapierbar.

1.2 *Große clostridiale Zytotoxine*

Zur Gruppe der großen clostridialen Zytotoxine gehören die strukturell und funktionell ähnlichen Exotoxine Toxin A und B von *C. difficile*, das letale und hämorrhagische Toxin von *C. sordellii* und das α -Toxin von *C. novyi*. Die Exotoxine sind Pathogenitätsfaktoren, die durch Reorganisation des Zytoskeletts morphologische Änderungen in eukaryonten Zielzellen bewirken. Sie sind einkettige Toxine, die aus drei Domänen bestehen, der Rezeptorbindedomäne, der Translokationsdomäne und der katalytischen Domäne. Sie sind Autotransporter und gelangen durch rezeptorvermittelte Endozytose ins Zytoplasma der Zielzellen, wo sie ihre Enzymaktivität entfalten. Die Toxine katalysieren den Transfer einer Glucoseeinheit von UDP-Glucose auf Rho- und Ras-

GTPasen. Allen clostridialen Zytotoxinen gemeinsam ist ein Aminosäuremotiv, das DXD-Motiv (Aspartat – beliebige Aminosäure – Aspartat), zur Koordination von Manganionen als Kofaktor der Glucosyltransferaseaktivität.

Wegen der klinischen Relevanz sind die Toxine A und B von *C. difficile* von den großen clostridialen Zytotoxinen am besten untersucht.

1.3 Die Toxine A und B

Die Toxine A und B von *C. difficile* sind einkettige Proteine mit einem Molekulargewicht von 308 bzw. 270 kDa und gehören damit zu den größten bekannten bakteriellen Toxinen. Die Gene mit 8133 bp bzw. 7098 bp besitzen 49 % Sequenzhomologie und sind auf einem 19,6 kb großen Pathogenitätslocus lokalisiert. Die Gene besitzen eigene Promotoren und Ribosomenbindungsstellen, die Expression der Gene wird jedoch vermutlich von einem gemeinsamen Promotor gesteuert (Hammond et al., 1997).

Die Toxine werden während der vegetativen Wachstumsphase produziert und als Exotoxine freigesetzt. Die Regulation der Toxinproduktion ist von den Wachstumsbedingungen und der Aminosäurezusammensetzung des Mediums abhängig (Haslam et al., 1986, Dupuy et al., 1998). Toxin A wird als Enterotoxin bezeichnet, da es im Tierversuch das Krankheitsbild der sekretorischen Diarrhö und Entzündung der Darmschleimhaut hervorruft (Kelly et al., 1994). Toxin B ist zwar *in vitro* um den Faktor 1000 zytotoxischer als Toxin A, wirkt aber kaum enterotoxisch isoliert im Tierversuch angewendet und wird daher als Zytotoxin bezeichnet (Lyerly et al., 1982).

1.3.1 Aufbau der Toxine A und B

Die einkettigen Proteine werden strukturell in drei Domänen unterteilt. Die katalytische Domäne, die die Glucosyltransferaseaktivität besitzt, befindet sich im N-terminalen Bereich der Proteine (ca. 20 % des Proteins, Hofmann et al., 1997). Der mittlere Teil ist mit einem hydrophoben Bereich, der Transmembrandomäne, an dem Aufnahmeprozess in die Zielzelle beteiligt und gewährleistet die Membraninsertion und Translokation der katalytischen Domäne ins Zytosol. Der C-terminale Bereich ist an der Bindung des

Toxins an den putativen Zellrezeptor beteiligt und besteht aus 30 repetitiven Oligopeptiden.

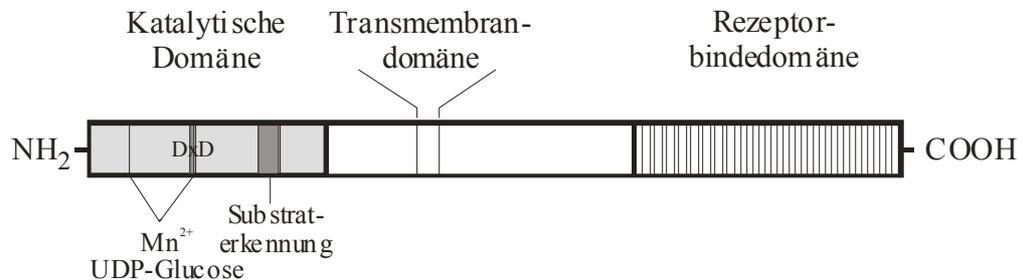


Abb. 1: Schematische Struktur des großen clostridialen Zytotoxins A von *C. difficile*. Das Toxin besteht aus drei Domänen. C-terminal befindet sich die Rezeptordomäne, die aus repetitiven Oligopeptiden besteht und die Bindung an die putativen Rezeptorstrukturen und die rezeptorvermittelte Endozytose ermöglicht. Die mittlere hydrophobe Region beinhaltet die Transmembrandomäne, die vermutlich eine Pore oder einen Kanal formiert und so die katalytische Domäne ins Zytoplasma transloziert. Die katalytische Domäne besitzt mono-Glucosyltransferaseaktivität und bindet und glucosyliert manganabhängig die Ziel-Rho-GTPasen.

Ein Rezeptor, der die Aufnahme der Toxine vermittelt, konnte bisher nicht näher charakterisiert werden. Einige Glucoproteine, wie Sucrase-Isomaltase, wurden als Toxin A-Rezeptorbestandteil identifiziert, jedoch werden sie nicht von allen toxinsensitiven Zellen exprimiert (Pothoulakis et al., 1996).

Da die Zytotoxizität des Toxins, die sich durch morphologische Änderungen der Zielzellen äußert, durch Alkalisierung des sauren endosomalen Kompartments inhibiert werden kann, geht man von einer Aufnahme der Toxine durch rezeptorvermittelte Endozytose und einer Translokation aus den sauren Endosomen in das Cytosol aus (Abb. 2). Eine Prozessierung ist für die intrazelluläre Toxizität nicht notwendig, was Mikroinjektionsversuche mit den Holotoxinen oder der N-terminalen, katalytischen Domäne von Toxin B zeigten (Hofmann et al., 1997). Die Mikroinjektion der katalytischen Domäne (Aminosäure 1-546 für Toxin B; 1-900 für Toxin A) führt zu den gleichen morphologischen Änderungen wie die des Holotoxins (Hofmann et al., 1997; Faust et al., 1998).

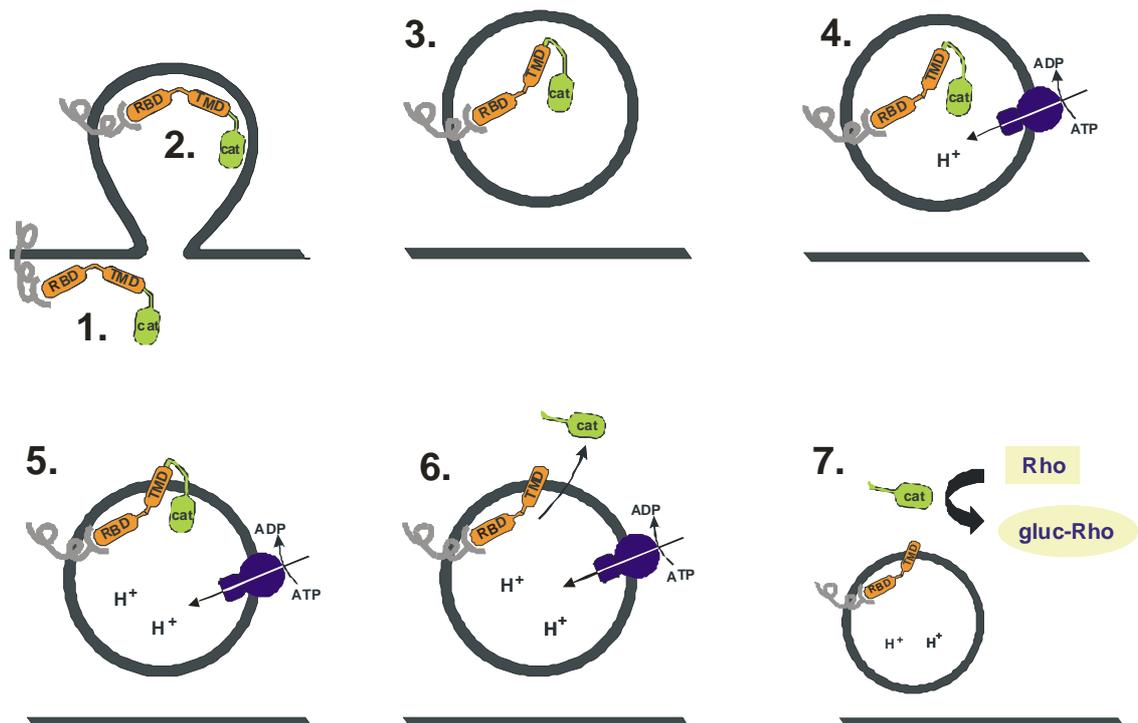


Abb. 2: Endozytose der clostridialen Toxine A und B. Mit der Rezeptorbindedomäne (RBD) bindet das Toxin an eine noch nicht identifizierte membranöse Rezeptorstruktur (1) und induziert so die rezeptorvermittelte Endozytose (2). Endozytierte Vesikel werden zu Endosomen prozessiert (3), in denen der pH-Wert durch die vesikuläre ATPase auf pH 5,5 gesenkt wird (4). Die Transmembrandomäne formiert sich in Folge des niedrigen pH-Wertes zu einer Pore, durch die die katalytische Domäne ins Zytosol proteolytisch freigesetzt wird (5; nur für Toxin B nachgewiesen), wo die Zielmoleküle monoglucosyliert werden. (Bildquelle: Just et al., 2004)

In der katalytischen Domäne besitzen die Toxine A und B das DXD-Motiv (Aspartat – beliebige Aminosäure – Aspartat), das an der Bindung eines Mangans beteiligt ist und für die Enzymaktivität von entscheidender Bedeutung ist. Der Austausch der Aspartate zu beliebigen Aminosäuren verhindert bei Mikroinjektion der katalytischen Domäne den zytotoxischen Effekt und die Glucosylierung (Busch et al., 1998).

1.3.2 Zytotoxische Effekte der Toxine A und B

In Folge der Toxinbehandlung kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Eine Vielzahl von Aktinkabeln durchspannen die Zellen und sind wichtige Elemente des Stützapparats der Zelle. Die Aktinkabel sind an Adhäsionspunkten in der Plasmamembran verankert. Unter dem Einfluß der Toxine kommt es zu einer Störung

des dynamischen Gleichgewichts von monomerem G-Aktin und polymerisiertem F-Aktin, was sich in Abbau und Umordnung der Aktinkabel auswirkt. *In vitro* mit Toxin A oder B vergiftet, verlieren adhärenente Zellen ihre Gestalt und runden ab. Zunächst bleiben neuritenartige Retentionsfasern erhalten, doch im späten Verlauf der Vergiftung verlieren die Zellen ihre Adhärenz und sind von kugeliger Gestalt. Im Zielgewebe der Toxine kommt es durch die Toxine zu einer Auflösung der Zell-Zellkontakte und zum Verlust der Colonepithelbarriere (Gerhard et al., 1998, Hecht et al., 1988)

Die zytotoxische Wirkung der Toxine A und B wird durch ihre Enzymaktivität vermittelt. Die spezifischen intrazellulären Zielmoleküle der Toxine sind die Rho GTPasen Rho, Rac und Cdc42.

Die Rho-Proteine sind kleine GTP-bindende Proteine, die als niedermolekulare GTPasen zur Superfamilie der Ras GTPasen gehören. Sie haben ein Molekulargewicht von 20 bis 23 kDa und im Unterschied zu den heterotrimeren G-Proteinen liegen sie als Monomere vor. Ihr Aktivitätszustand wird von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren kontrolliert, indem der Austausch von GDP zu GTP zur Aktivierung der Rho-GTPasen führt. Die Rho-Proteine sind die Hauptregulatoren des Aktinzytoskeletts und der damit verbundenen Zellfunktionen wie Morphologie, Motilität, Zell-Zell-Kontakt, sowie Endo- und Exozytose. Darüber hinaus sind sie auch in die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und in die Regulation des Zellzyklus eingeschaltet.

Die Toxine A und B übertragen manganabhängig einen Glucoserest vom ubiquitär vorkommenden Kosubstrat UDP-Glucose auf einen Threoninrest der GTPasen. Im Falle des RhoA wird der Glucoserest an Threonin 37 (Just et al., 1995), im Falle von Rac- und Cdc42 an Threonin 35 (Popoff et al., 1996, Just et al., 1996) kovalent gebunden.

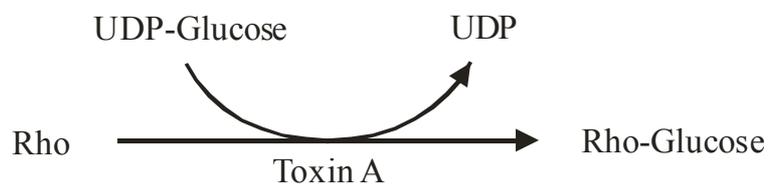


Abb. 3: Enzymaktivität des Toxins A am Beispiel der Glucosylierung von Rho-Proteinen. Vom Kosubstrat UDP-Glucose wird durch das Toxin an Threonin 37 des Rho-Proteins die Glucose kovalent gebunden. Glucosylierte Rho-Proteine binden bei Aktivierung nicht an ihre Effektoren, und Rho-abhängige Signalwege sind somit unterbrochen.

Der gebundene Glucoserest verhindert nun, dass die Effektorregion nach Aktivierung der Rho-GTPasen die Konformation annimmt, die die Bindung an die Effektorproteine und somit die Signalweiterleitung ermöglicht.

1.3.3 Proinflammatorische Wirkung

Die Wirkungen der Toxine A und B auf das Zytoskelett und auf die Regulation der Zell-Zellkontakte im Darmepithel lassen sich hinreichend durch die Inaktivierung der Rho-GTPasen erklären. Es wird vermutet, dass es zusätzliche proinflammatorische Wirkungen der Toxine gibt, die nicht auf der Enzymaktivität beruhen.

Die Toxine A und B bewirken neben der Flüssigkeitssekretion in das Darmlumen und der Zerstörung der intestinalen Epithelstruktur eine Degranulation der Mastzellen und Freisetzung von inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und dem Tumor Nekrosis Faktor (TNF α) im entzündlichen Gewebe. Toxin A verursacht *in vitro* die Migration von Neutrophilen (Warny et al., 2000; Branka et al., 1997).

Beobachtungen weisen darauf hin, dass diese zellulären Antworten frühzeitig nach der Intoxikation der Zellen und somit vermutlich unabhängig von der Inaktivierung der Rho-Proteine auftreten. Die Aktivierung der p38-mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAP-Kinase) als bedeutendster Aktivator der IL-8-Freisetzung geschieht bei Toxin A Behandlung zeitlich deutlich vor der Rho-Inaktivierung (Warny et al., 2000). Ebenso wird berichtet, dass die Freisetzung von IL-8 durch Toxin A in Folge der schädigenden Wirkung auf Mitochondrien erfolgt, die mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen einhergeht.

1.3.4 Mitochondrienschädigung bei Apoptose

Die Toxine A und B bewirken zeit- und dosisabhängig den Übergang der Darmepithelzellen in die Apoptose, den programmierten Zelltod (Brito et al., 2002). Zellmorphologisch wird die Apoptose durch rezeptorvermittelte Signale oder Mitochondrienschädigung gestartet und ist durch DNA-Fragmentierung, Volumenabnahme, Membranausstülpungen und Zerfall der Zelle in Vesikel charakterisiert (Cryns et al., 1998). Auf molekularer Ebene vermitteln Caspasen die extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignale bis zur Exekution des programmierten

Zelltods. Ein Apoptosesignalweg in eukaryontischen Zellen ist der Cytochrom C-initiierte Signalweg, bei welchem apoptotische Signale, wie der TNF α -vermittelte, bewirken, dass die Mitochondrienmembranen durch eingelagerte Bax/Bak-Oligomere permeabilisiert werden und Cytochrom C in das Cytoplasma freigesetzt wird. Mit dieser Freisetzung geht die Aktivierung von Caspasen und der anschließende Zelltod einher (Jiang et al., 2004).

Toxin A bewirkt eine Schädigung der Mitochondrien innerhalb von 15-30 min nach Vergiftung (Liu et al., 2000, He et al., 2002). Ob bei der Vergiftung der Zellen mit Toxin A und B die Inaktivierung der Rho-Proteine Ursache für den Übergang der Zellen in die Apoptose ist, ist ungeklärt. Als Maß für die Anzahl der intakten Mitochondrien sinkt die intrazelluläre ATP-Konzentration bereits innerhalb von 15 Minuten nach Vergiftung mit Toxin A auf 1/5 der Konzentration und die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien ist bereits nach 30 min Zeit nachweisbar (He et al., 2000), was zeitlich vor der messbaren Rho-Inaktivierung geschieht und so auf die Rho-unabhängige Einleitung der Apoptose hindeutet.

1.4 Aufreinigung des clostridialen Toxin A

Die derzeit etablierte Präparation von clostridialem Toxin A aus *C. difficile*-Kulturüberständen ist ein mehrtägiges Verfahren (Just et al., 1997; Krivan et al., 1987). Dieses beinhaltet das 3-tägige Wachstum der Bakterien unter anaeroben Bedingungen, Ammoniumsulfatpräzipitation der Proteine aus dem Kulturüberstand, Renaturierung und Dialyse, sowie anschließender Ionenaustauschchromatographie zur Trennung von Toxin B von Toxin A. Toxin A wird weiter über die spezifische temperaturabhängige Bindungseigenschaft an Thyreoglobulin gereinigt. Diese 7 Tage dauernde Aufreinigung des Toxins aus dem Kulturmedium gewährleistet keinen Ausschluß von Toxin-assoziierten Faktoren wie Chaperonen, die eine zusätzliche Wirkung auf Zielzellen haben können.

1.5 Expression von rekombinantem Toxin A und B

Toxin A und B gehören zu den größten bekannten bakteriellen Proteintoxinen. Obwohl bereits 1990 die codierenden Sequenzen für Toxin A und B beschrieben worden sind

(Sauerborn et al., 1990, Schulze et al., 1990), wurde erst kürzlich die rekombinante Herstellung und Anwendung des rekombinanten Toxin B von Pfeiffer et al. beschrieben (2003). Zuvor wurden nur Fragmente der Toxine rekombinant hergestellt, die der Aufklärung von Funktionen der einzelnen Domänen sowie für Bindungsstudien und als Immunogen dienten (Sauerborn et al., 1997; Faust et al., 1998; Ward et al., 1999; Frisch et al., 2003; Letourneur et al., 2003 für Toxin A. Für Toxin B: Hofmann et al., 1997; Hofmann et al., 1998; Soehn et al., 1998; Spyres et al., 2001). Die Expression des Holotoxin A in *E. coli* wurde 1998 von Kink und Williams beschrieben, die Ausbeute war aber zu gering, um das Protein als Immunogen zur Antikörperbildung einzusetzen.

1.6 Das *Bacillus megaterium*-System

Bacillus megaterium wird in der Molekularbiologie zur stabilen Expression von heterologer DNA eingesetzt. In diesem Expressionssystem ist es möglich, mit kostengünstigem Medium in sehr kurzer Zeit hohe Proteinmengen zu erreichen. *B. megaterium* besitzt keine alkalischen Proteasen, somit ist der Fremdproteinertrag mit sehr geringer Degradation zu erhalten (Meinhardt et al., 1989; Rygus und Hillen, 1991). Der Expressionsvektor pWH1520 (Fa. MobiTec) ist in *E. coli* replizierbar und in *B. megaterium* transformierbar. Die Expression der heterologen DNA in *B. megaterium* ist der Regulation eines mit Xylose induzierbaren Promotors unterstellt.

Das System ist zur Expression des Toxin A-Gens geeignet, da in diesem System im Gegensatz zur Expression in *E. coli* keine Endotoxine, wie z.B. Lipopolysaccharide, vorkommen. Lipopolysaccharide können Toll-Rezeptoren eukaryontischer Zellen aktivieren und somit als Verunreinigung bei der Aufklärung von Signalwegen stören.

1.7 Zielsetzung

Das 308 kDa große *C. difficile* Toxin A soll rekombinant hergestellt werden. Nur das rekombinante Toxin A ist frei von möglichen weiteren clostridialen Faktoren, die zur fehlerhaften Interpretation bei Untersuchungen von Signalübertragungswegen führen können. Zur Expression des Toxins soll das *B. megaterium*-System etabliert werden. Das Toxin A soll 6xHistidin-markiert exprimiert werden, um eine einstufige Reinigung durchführen zu können. Das rekombinante Toxin A soll mit dem clostridialen

originären Toxin A bezüglich der Erkennung durch spezifische Antikörper, Zytotoxizität, Glucosyltransferase-Aktivität und der Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien verglichen werden. Bei vergleichbarer biologischer Wirkung soll das rekombinante Toxin A in der Zellkultur eingesetzt werden, um die inflammatorische Wirkung, insbesondere die Aktivierung der p38 MAP Kinase, frei von clostridialen Faktoren zu untersuchen.

2 MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

Clostridium difficile Stamm VPI 10463

Escherichia coli Stämme TG1 und XL-1Blue, Firma Stratagene

Bacillus megaterium Stamm WH320 (*lac⁻xyl⁺*), Firma MobiTec

2.2 Zelllinien

CaCo-2-Zellen Humane intestinale Epithelzellen

CHO-6-Zellen Ovarzellen des chinesischen Hamsters

HT29-Zellen Humane Kolonkarzinomzellen

HUVEC-c-Zellen Humane Venenendothelzellen aus der Nabelschnur

Swiss 3T3 Fibroblasten der Maus

2.3 Plasmide

pCR2.1-TOPO

Der Vektor pCR2.1-TOPO wird von der Firma Invitrogen angeboten. Von Vorteil ist die schnelle, effiziente Klonierung von PCR-Produkten, die durch Taq-Polymerase amplifiziert werden. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz sowie ein *LacZ*-Fragment zur Selektion. Klone ohne Insert sind in der Lage, der Agarplatte zugesetztes X-Gal umzusetzen. Hierdurch erhalten die Klone, die kein gewünschtes Insert tragen, aber dennoch die Antibiotikaresistenz erworben haben, eine blaue Farbe. Ein Insert unterbricht das *LacZ*-Fragment und die Klone bleiben wegen der fehlenden Umsetzung des X-Gal weiß.

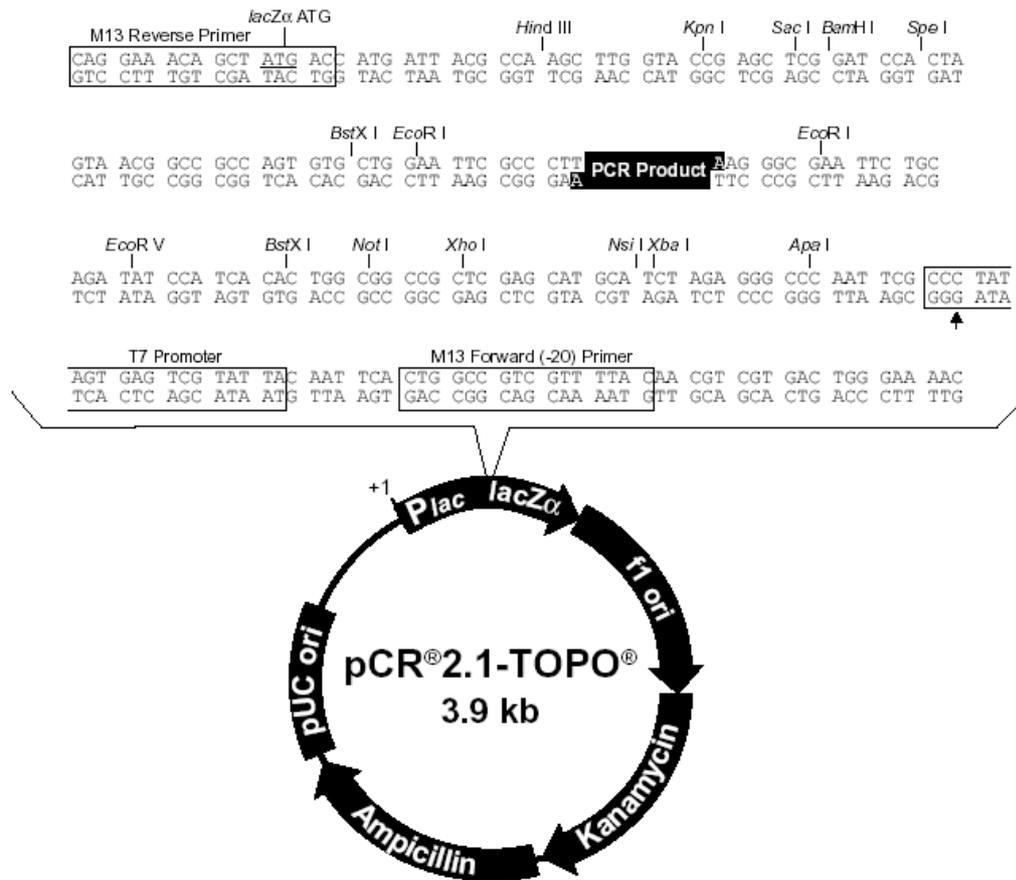


Abb. 4: Plasmidkarte des von Invitrogen bezogenen Vektors pCR2.1-TOPO TOPO

pWH1520

pWH1520 ist ein Klonierungs-Shuttlevektor für *E. coli* und *B. megaterium*. Die Klonierung erfolgte in *E. coli*, die Expression nicht-homologer DNA in *B. megaterium*. Die Selektion von transformierten *E. coli* wird über die Ampicillinresistenz erreicht, die Tetracyclinresistenz wird für das *B. megaterium*-System ausgenutzt. Die Expression eines integrierten Gens ist in *B. megaterium* durch die Zugabe von Xylose induzierbar, wodurch der *xylA*-Promotor aktiviert wird und das Xyloseoperon exprimiert wird.

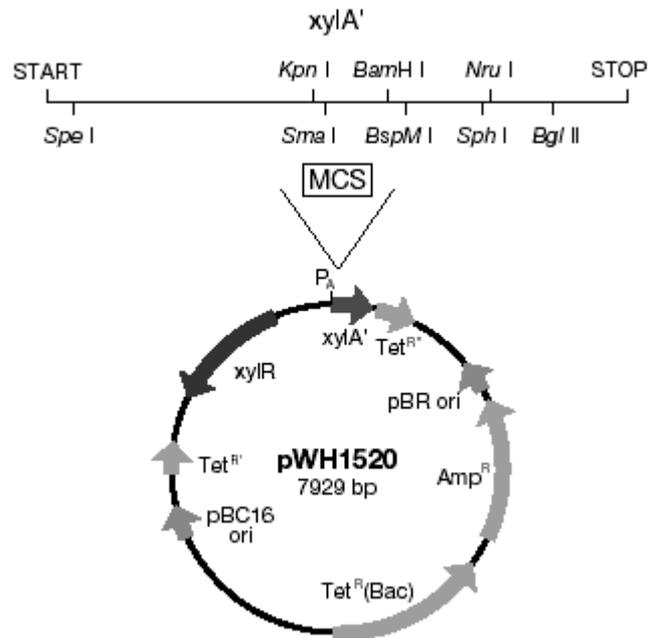


Abb. 5: Plasmidkarte des pWH1520 der Firma MobiTec, dem Shuttle-Vektor für *E. coli* / *B. megaterium*. Tet^{R'}, Tet^{R''} unterbrochene Tetracyclinresistenz, Amp^R Ampicillinresistenz, XylR Xylose-abhängiger Repressor, XylA' Xylose Isomerase, P_A xylA-Promotor, MCS Multipler Klonierungsbereich, pBC16ori Bacillus Replikationsstartpunkt, ColE1 Replikationsstartpunkt.

2.4 Enzyme und Kits

Tab. 1: Verwendete Enzyme und Kits

Enzym/ Kit	Hersteller
DNaseI	Boehringer
Genome-Star-TM-System; Gesamt-DNA-Isolations-Kit	Hybaid GmbH
Jet Sorb Geextraktionskit	Genomed GmbH
Plasmid Miniprep-Isolationskit	PeqLab Biotechnologie GmbH
Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH
Restriktionsendonukleasen	BioLabs
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Perbio
T4 Ligase	BioLabs

2.5 Oligonukleotide

Folgende ausgewählte Oligonukleotidprimer wurden für die PCR zur Sequenzierung eingesetzt (die Toxin A Sequenz und weitere für die Arbeit verwendete Oligonukleotide befinden sich im Anhang A und B)

Tab. 2: Eingesetzte Oligonukleotidprimer Die Angaben zur Position der Primer bezieht sich auf die Toxin A-Sequenz des *Clostridium difficile* VPI10463.

Primer fürs Toxin A-Gen (<i>Clostridium difficile</i>) 5' → 3'		
intern	Primerbezeichnung	Sequenz
24	<i>tcdABamHI</i> sense ab*1	5'-ACGTGGATCC ATG TCT TTA ATA TCT AAA GAA G-3'
3	<i>tcdA367-387</i>	5'-GAA TAT AAT ATT AAA CTG TGG-3'
SC	SC-ToxA ab 745	5'-GAG TTA TTA AAT ATT TAT AGT CAG G-3'
4	<i>tcdA1135-1155</i>	5'-GGC AGT GTT ATA AAT CAA GCC-3'
5	<i>tcdA1530-1552</i>	5'-GAC AGA ACA AGA AAT AAA TAG TC-3'
6	<i>tcdA1894-1918</i>	5'-GAA TTA AAT AAA TAT AGG ATA CCT G-3'
7	<i>tcdA2515-2536</i>	5'-TAT TAT GAA AAA TTA GAG CCT G-3'
1N	<i>tcdA1N</i> ab *2700 reverse	5'-GGATCC *TAC AGA GTA AGT TGA ATT AT-3'
20	<i>tcdA2810-2831</i>	5'-GTA TAA TTA CAG ATG TTA ATG G-3'
(8)	<i>tcdA2851-2870</i>	5'-CAG TTA GAT CAT ACT TCT C-3'
23	<i>tcdA2977-2996</i>	5'-GCT CAA CTA TTT AGT ACA GG-3'
9	<i>tcdA3235-3257</i>	5'-GCA ACT GTA GCT TCA ATT GTT GG-3'
10	<i>tcdA3625-3646</i>	5'-GGT ATA GAA ACA GAA AAT CTA G-3'
11	<i>tcdA4034-4057</i>	5'-GGA TAT TTA ATA TTG ATA ATG AAG-3'
1446C	<i>tcdA1446-C</i> ab *4336	5'-GGATCC *GAG AAA ATC AAT ACT TTA GG-3'
12	<i>tcdA4705-4726</i>	5'-GTG AAA AAT TCA GAT GGA CAC C-3'
13	<i>tcdA5056-5077</i>	5'-AAA GTA TTG ATA GCA CCT G-3'
14	<i>tcdA5539-5559</i>	5'-GAA TTT AAC TTA GTA ACT GG-3'
15	<i>tcdA5926-5945</i>	5'-TAT TTC AAT CCT GAC ACT GC-3'
(16)	<i>tcdA6330-6349</i>	5'-CTT TAA TAC TAA CAC TGC TG-3'
17A	Primer#17 (6726-6746anti)	5'-CCA TCA TAA CTA AAG TAA TAC-3'
17	<i>tcdA6726-6746</i>	5'-GTA TTA CTT TAG TTA TGA TGG-3'
18	<i>tcdA7093-7111</i>	5'-GAA GCA GCT ACT GGA TGG C-3'
19	<i>tcdA7381-7400</i>	5'-GGA CTG CGA ACT ATT GAT GG-3'
25	<i>tcdABamHI</i> anti ab*8133	5'-ACGTGGATCC TTA GCC ATA TAT CCC AGG-3'

2.6 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Biolabs bezogen. Die Schnittstellen der verwendeten Enzyme sind in Tabelle 3 angegeben.

Tab. 3: Restriktionsendonukleasen und deren DNA-Erkennungssequenzen

	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> H I	5'... G [▼] GATCC ...3' 3'... CCTAG [▲] G...5'
<i>Hind</i> III	5'... A [▼] AGCTT ...3' 3'... TTCGA [▲] A...5'
<i>Spe</i> I	5'... A [▼] CTAGT ...3' 3'... TGATC [▲] A...5'

2.7 Antikörper

Tab. 4: Verwendete Antikörper

Antikörper		Hersteller, Verdünnung, Inkubationszeit
anti-Toxin A	Polyklonaler Antikörper gegen <i>Clostridium difficile</i> Holotoxin A (Kaninchen)	Harald Genth, Abt. Toxikologie, MHHannover
anti-His-Tag	Antikörper gegen Histidin-markierte (6x Histidin) Proteine (Maus)	Quiagen
anti-p38	Mausantikörper gegen p38	1:1000, über Nacht, 4 °C
anti-phospho-p38	Antikörper gegen die phosphorylierte Form der p38 (Mausantikörper)	CellSignaling, 1:1000, über Nacht, 4 °C
anti-IκB	Antikörper gegen IκB (Mausantikörper)	Santa Cruz, 1:200, über Nacht, 4 °C
anti-phospho-JNK	Mausantikörper gegen die phosphorylierte Form der JNK	Cell Signaling, 1:1000, über Nacht, 4 °C
anti-Rac1	Mausantikörper gegen Rac1	Santa Cruz, über Nacht, 4 °C

anti-RhoA	Mausantikörper gegen RhoA	Santa Cruz, über Nacht, 4 °C
goat-anti mouse, Peroxidase	Peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper (Ziege) gegen Mausantikörper	Rockland, 1:5000, > 30 min, Raumtemperatur
goat-anti rabbit, Peroxidase	Peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper (Ziege) gegen Kaninchenantikörper	Rockland, 1:5000, > 30 min, Raumtemperatur

2.8 Geräte (Auswahl)

Tab. 5: Verwendete Geräte mit Typbezeichnung und Herstellerangabe

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	EL 5075	Tuttnauer Systec
Blotgerät	Semi Dry Transfer Cell	Transblot [®] SD, Biorad
FPLC	BioLogic HR workstation, fraction collector Model 2128, Autoinjection valve AV73	Biorad
FPLC-Säule (Nickel)	Hi-Trap [™] Chelationg HP column	AP Biotech, Schweden
French Press	French [®] Pressure Cell Press	SIM-Aminco Spectronic Instruments
Geldokumentationsanlage	Image Station 440 CF, Kodak 1D 3.5 Network	Kodak digital science
Inkubator	Refrigerated Incubator Shaker, innova 4330	New Brunswick Scientific
Kamera	Kappa image Base	Kappa
Mikroskop	HAL 100	Zeiss
PCR-Gerät	iCycler	Biorad
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
PhosphoImager mit Optiquant Software	Cyclone Storage Phosphor Screen	Canberra Packard BioScience Company
Spektrometer	Smartspec [™] 3000	Biorad
Ultraschall	Sonoplus	Bandelin electronic
Ultraschallstab	UW 2200	Bandelin electronic
Ultrazentrifuge	RC 150 GX	Sorvall
Ultrazentrifugenrotor	S120 AT2-088	Sorvall

2.9 Chemikalien

Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Substanzen

Name	Hersteller
Agarose, universal	Peqlab
Ammonium-Persulfat	Sigma
Ampicillin, Na-Salz	Serva
Antibiotic Medium 3	Becton Dickinson
Bacto™ Agar	Becton Dickinson
Bacto Trypton	Becton Dickinson
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson
Bradford Reagenz	Fluka
Brain Heart Infusion	Becton Dickinson
Bromphenolblau	Merck
BSA	Serva
Calciumchlorid	Fluka
Chloramphenicol	Fluka
Coomassie Brilliantblau R250	Merck
DMEM	Biochrom
Dithiothreitol	Serva
EDTA	Sigma
Essigsäure 96 %	J.T. Baker
Ethanol	J.T. Baker
D-Glucose	Merck
Glu-Sepharose-4B	Amersham Pharmacia Biotech
Glutathion, reduziert	Sigma
Glycerin	Sigma
HEPES	Serva
IPTG	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid	Ferosa
Maleinsäure	Sigma
Manganchlorid	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	J.T. Baker

Nonidet P40 (NP40)	Fluka
PMSF	Serva
Polyethylenglykol	Sigma
L-Prolin	ICN Biomedicals
Proteinaseinhibitor-Mix	Roche Diagnostics GmbH
Saccharose	Merck
Salzsäure	J.T. Baker
SDS	Pierce
TEMED	Sigma
Thrombin	Roche
Thymidin	Sigma
Tris	ICN Biomedicals
Triton X-100	Sigma
Trypton	Becton Dickinson
UDP- ¹⁴ C-Gluc	American Radiolabeled Chemicals
UDP- ¹⁴ C-GlcNac	Amersham Pharmacia Biotech
D-(+)-Xylose	ICN

2.10 Puffer und Lösungen

Tab. 7: Verwendete Puffer, deren Inhalt im Methodenteil nicht beschrieben ist

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung	pH
<i>B. megaterium</i> -Lysispuffer	10 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 5 mM β -Mercaptoethanol 100 μ M PMSF	7,5
Bakterienlysispuffer	20 mM TrisHCl 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM DTT 1 mM PMSF	7,4
Blot-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol	
Entfärbelösung für SDS-Gele	7,5 % (v/v) Essigsäure 96 % 5,0 % (v/v) Methanol	
Färbelösung für SDS-Gele	2,5 g/l Coomassie Brilliantblau R250 45,5 % (v/v) Methanol 9,2 % (v/v) Essigsäure 96 %	

<i>FPLC: B. megaterium</i> -Lysispuffer für den FPLC-Lauf	300 mM NaCl 20 mM Imidazol 20 mM NaH ₂ PO ₄ 100 µM PMSF 500 mM EDTA 10 µg/ml Leupeptin	8,0
FPLC: Elutionspuffer	250 mM Imidazol 300 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄	8,0
GST-fish-Puffer	10 % (v/v) Glycerol 50 mM Tris 1 % NP ₄₀ 2 mM MgCl ₂ 5 µg/ml Aprotinin 100 µM PMSF 1 µg/ml Leupeptin 1 mM Benzamidin	7,4
Laemmli-Probenpuffer (5x)	100 mM Tris 10 % (w/v) SDS 25 % Glycin 2 g/l Bromphenolblau 100 mM DTT	6,8
Laufpuffer für SDS-Gele	1,92 M Glycin 0,25 M Tris 0,1 % (w/v) SDS	
Mowiol-Einbettmedium	200 mM Tris-HCl 10 % (w/v) Mowiol 25 % (v/v) Glycerol	8,5
PBS-Puffer	137 mM NaCl 3 mM KCl 6,6 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄	7,4
Ponceau S-Färbelösung	0,15 % Ponceau S 0,5 % (v/v) Eisessig	
Probenauftragspuffer (6x) für Agarosegelelektrophorese	TAE 6x 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 0,04 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % (v/v) Glycerol	

Sucrose-Puffer	210 mM Mannitol 70 mM Sucrose 1 mM EDTA 10 mM HEPES 100 µM PMSF 10 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Aprotinin	7,5
TAE (50x)	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA	7,8
TBS-T-Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20	7,4
Thrombinspaltpuffer	50 mM TrisHCl 50 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂	8,0
TSS-Puffer	85 % LB-Medium 10 % Polyethylenglycol 8000 (Sigma) 5 % DMSO 50 mM MgCl ₂	
Tyrodepuffer	130 mM NaCl 5 mM KCl 1,4 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5,6 mM Glucose 10 mM HEPES	7,4

2.11 Standards

Für die Agarosegelelektrophorese wurde *Hind* III-verdaute Lambda-DNA als Größenmarker eingesetzt. Die Fragmentgrößen betragen 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 125 bp. Als Proteinmarker für SDS-PAGE diente der high-molekular-weight-Proteinmarker von der Firma Biorad mit Proteinen der Größen 205, 116, 97,4, 66, 45, und 29 kDa bzw. der low-molekular-weight-Proteinmarker mit Proteinen der Größen 113, 92, 53,3, 35,3, 28,7 und 21,3 kDa.

3 METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht von *C. difficile* VPI 10463 zur Isolierung von Toxin A

Sporen von *C. difficile* sind über 2-3 Monate in Brain Heart Infusion-Medium bei 4 °C unter anaeroben Bedingungen lagerungsfähig (37 g Brain Heart Infusion (BHI) auf 100 ml H₂O).

Zur Vorbereitung einer Kultur für eine quantitative Isolierung von Toxin A wurden 10 ml dieser auf 37 °C erwärmten Stammkultur um den Faktor 10 mit BHI verdünnt und in einem Anaerobiertopf für 48 h bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde mit 900 ml 0,9 % NaCl in einen Dialyseschlauch gefüllt und dieser in 5 l BHI gehängt. Nach 36 h Inkubation bei 37 °C wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs in Zentrifugenbecher überführt. Durch Zentrifugation bei 8000 Upm für 20 min wurden die Bakterien vom Medium getrennt, aus dem die freigesetzten Toxine A und B isoliert werden konnten (vergl. Kapitel 3.3.6).

3.1.2 Anzucht der *Escherichia coli*-Stämme

Die Bakterienstämme *E. coli* TG1 und XL-1Blue wurden in sterilem LB-Medium bei 37 °C als stationäre Schüttelkultur angezogen. Die Selektion der plasmidtragenden Zellen erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml.

3.1.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (nach Sambrook et al., 1989; mod.)

Kompetente Zellen sind in der Lage, freie DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit der Zellen ändert sich mit ihrem physiologischen Zustand. Die Ausprägung der Kompetenz ist während der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten und sinkt danach rasch ab. Um Fremd-DNA in Bakterien einschleusen zu können, müssen die Zellen in den Zustand der Kompetenz gebracht werden. Mit einer frischen *E. coli*-Kolonie des betreffenden Stammes wurden 5 ml LB_{amp}-Medium beimpft und als Schüttelkultur bei

200 Upm und 37 °C über Nacht inkubiert. Diese Kultur diente als Vorkultur für 500 ml Hauptkultur. Die Kultur wurde bei gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 0,5 Extinktionseinheiten bei einer Wellenlänge von 550 nm inkubiert (ca. 2-3 h Inkubation) und anschließend gekühlt geerntet. Alle folgenden Zentrifugations- und Arbeitsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4300 Upm sedimentiert, in 50 ml sterilem TSS-Puffer resuspendiert und sofort, 500 µl weise portioniert, bei -80 °C eingefroren und bis zur Transformation gelagert.

3.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von frei löslicher DNA in Bakterien ist auf solche Bakterien beschränkt, die über entsprechende Kompetenz (Kap. 3.1.3) verfügen. Zur Transformation wurde der Bakterienstamm *E. coli* TG1 als Rezipient für rekombinante DNA eingesetzt. 200 µl tiefgefrorene kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von ca. 20-150 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Zur Steigerung der DNA-Aufnahme in die Zellen erfolgte anschließend eine Inkubation für 1 min bei 42 °C. Die Bakterien wurden auf Eis kurz abgekühlt und zur Ausbildung der auf dem Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz für 45 min bei 37 °C und 700 Upm inkubiert. 50-150 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB_{amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Transformation von *Bacillus megaterium*

B. megaterium eignet sich zur stabilen und effizienten Proteinexpression durch Xyloseinduktion. *B. megaterium* fehlen im Vergleich zu anderen *Bacillus*-Stämmen alkalische Proteasen, im Vergleich zu *E. coli* findet man keine Endotoxine, was eine hohe Reinheit der zu exprimierten Proteine gewährleistet. Das Xyloseoperon wurde von Rygus und Hillen (1991) beschrieben. Transformierbare Protoplasten des Stammes *B. megaterium* WH320 sowie der *E. coli* / *B. megaterium*-Shuttle-Vektor pWH1520 wurden von der Firma MobiTec, Göttingen, bezogen. Die Transformation der Protoplasten erfolgte nach Anweisungen der Firma. Demnach wurde die Aufnahme von

Plasmid-DNA in die zellwandlosen Protoplasten durch Behandlung mit Polyethylenglykol induziert. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte durch Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml auf Top-Agarplatten.

3.2 Methoden zur DNA-Analyse und Plasmidkonstruktion

3.2.1 Reinigung und Konzentrierung von chromosomaler DNA

Die chromosomale DNA von *C. difficile* wurde mit Hilfe des Genome-Star-Kits nach Herstellerangaben isoliert. Als Ausgangsmaterial dienten 10 ml Stammkultur *C. difficile* VPI 10463. Die Reinigung basiert auf alkalischer Lyse der Bakterienzellwand und Extraktion der Proteine mit Phenol/Chloroform. Die DNA wurde zur Ankonzentrierung mit 96 % Ethanol gefällt und anschließend in Wasser gelöst.

3.2.2 Plasmid-DNA-Aufreinigung

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid-Prep-Kits der Firma PeqLab isoliert. Hierzu wurden 5 ml einer stationären Bakterienkultur pelletiert. Mittels im Kit enthaltener Puffer wurden die Bakterien lysiert, RNA und Proteine extrahiert und die DNA auf eine Säulenmatrix gegeben. Nach Zentrifugation von 1 min bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge wurde die an die Säule gebundene DNA mit Puffer gewaschen. Zur Elution der DNA wurden 60 µl H₂O_{bidest.} auf die Säule gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min zentrifugiert.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch in 1 cm Quarzküvetten durch das Smartspec-Photometer der Firma Biorad. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Extinktion von „1“ einer DNA-Konzentration von 50 ng doppelsträngiger DNA pro Milliliter bzw. 30 µg einzelsträngiger linearer DNA pro Milliliter. Durch Bildung des Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Dabei gilt, dass eine proteinfreie DNA-Lösung einen Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm von 1,8 aufweist. Bei

Verunreinigung der DNA-Probe durch Protein verkleinert sich dieser Wert (Sambrook et al., 1989).

3.2.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen können DNA-Moleküle in definierte Fragmente zerlegt werden, die anschließend zur Analyse und Konstruktion neuer DNA-Moleküle eingesetzt werden können.

Die Spaltung an den für das jeweilige Enzym spezifischen Erkennungssequenzen erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, für 120 min bei 37 °C. Alle Restriktionsspaltungen wurden unter vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen (Enzymaktivität/DNA-Menge, Salzkonzentration des Reaktionsansatzes und Reaktionstemperatur) durchgeführt. Gleiches gilt auch für Ansätze mit gleichzeitiger Spaltung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Jeder Restriktionsansatz wurde anschließend zur Überprüfung gelelektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

3.2.5 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 1 %-igen (w/v) Agarosegelen in Gelelektrophoresekammern mit TAE als Laufpuffer. Die Lösung von Agarose in TAE-Puffer wurde zum Kochen gebracht, auf 60 °C abgekühlt, und in eine Gelgießvorrichtung gegossen. Kurz vor dem Gießen wurde die Lösung mit Ethidiumbromidlösung (~1 µg/ml) versetzt, um die Nukleinsäuren im Agarosegel durch UV-Licht sichtbar machen zu können.

Die DNA-Proben wurden mit Probenauftragspuffer versetzt, um sie zu beschweren und die Lauffront zu markieren. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 45-120 min bei 90 V. Bei UV-Licht von 245 nm konnten die DNA-Banden durch die Image-Station dokumentiert werden.

3.2.6 Präparative DNA-Aufreinigung mittels Jet-Sorb-Gelextraktionskit

Die präparative Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um Mikrogrammmengen an DNA-Fragmenten aus Agarosegelen zu isolieren. Die DNA wurde bei möglichst kurzer

Beleuchtung mit UV-Licht (254 nm) mit einem Skalpell möglichst exakt aus dem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel geschnitten und anschließend durch das Jet-Sorb-Gelextraktionskit isoliert. Die Agarose wurde durch Erhitzen auf 50 °C verflüssigt und die DNA an eine Matrix gebunden, von der sie nach mehrfachen Waschschritten eluiert werden konnte.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und stumpfen DNA-Enden unter ATP-Verbrauch.

Die Ligation von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Fragment-DNA betrug in der Regel etwa 1:4, die absoluten Mengen lagen zwischen 10 und 500 ng DNA pro 10 µl; 1000 Units/µl T4-Ligase wurden für den Ansatz verwendet. Die Inkubationsdauer betrug bei 16 °C 20 h, bei Raumtemperatur 4 h.

3.2.8 TA-Cloning

DNA, die durch eine PCR mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurde, lässt sich durch das TA-Cloning-System der Firma Invitrogen in einem Schritt in den *E. coli*-Expressionsvektor pBAD-TOPO ligieren. Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus ermöglicht eine gleichzeitige Restriktion des Vektors und Ligation mit PCR-amplifizierter DNA. Amplifizierte DNA wurde nach den TA-Cloning Kit-Angaben in den Vektor pBAD-TOPO ligiert und in im Kit enthaltene kompetente One-Shot-TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion der plasmidtragenden Bakterien erfolgte durch Ampicillin.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können *in vitro* bestimmte DNA-Abschnitte mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase vermehrt werden (Saiki et al., 1985). Die beiden Oligonukleotide (Primer 1 und 2) besitzen unterschiedliche Sequenz, die im einen Fall zum Minus-Strang, im

anderen Fall zum Plus-Strang komplementär ist. Die 3'-Enden der Primer weisen hierbei aufeinander zu und flankieren den DNA-Bereich, der *in vitro* vermehrt werden soll. Zur Amplifikation wird das Template zunächst durch Hitze denaturiert, damit bei anschließender Abkühlung die Primer mit der einzelsträngigen Template-DNA hybridisieren können (Annealing).

Die DNA-Synthese (Elongation) erfolgt danach in Gegenwart der Polymerase und der vier dNTPs bei einer optimalen Reaktionstemperatur. Denaturierung, Annealing und Elongation werden über mehrere Zyklen wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA kommt. Die PCR wurde im 50 µl Maßstab mit dem iCycler der Firma Biorad durchgeführt.

Als DNA-Polymerase wurden je PCR-Ansatz 2,5 U Expand Long Template Polymerase (ELT; TcdA1, TcdA2) oder Pfu-Polymerase (TcdA3, gerichtete Mutationen) in jeweiligem 1x Puffer verwendet. Ein Ansatz bestand aus 10 pmol jeden Primers, 40 mM dNTPs und ca. 400 ng Template-DNA in H₂O_{dest.}

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

1. Denaturierung: 30 s 94 °C
 2. Denaturierung: 30 s 94 °C
 3. Primer-Anlagerung: 30 s 48 °C -50 °C
 4. Kettenverlängerung: 210 s 70 °C für die ELT-Polymerase bzw.
360 s 72 °C für die Pfu-Polymerase
 5. Kettenverlängerung nach dem letzten Zyklus: 210 s 70 °C für die ELT-Polymerase
bzw. 360 s 72 °C für die Pfu-Polymerase
- Anzahl der Zyklen (Punkte 2-4): 18-25

Die DNA des PCR-Ansatzes wurde anschließend zur Ligation in einen Vektor verwendet.

3.2.10 Kinasieren nach PCR-Amplifikation

Zur Ligation von PCR-Amplifikaten in den Vektor pBAD-TOPO durch das TOPO TA-cloning system (Invitrogen, Kap. 3.2.8) sind 3'-A-Überhänge nötig. Durch die 3' → 5'-proofreading-Exonuclease-Aktivität der pfu-Polymerase werden diese Überhänge jedoch entfernt. Die 3'-A-Überhänge wurden durch Kinasieren nach der Amplifikation

generiert, indem dem PCR-Ansatz 1 U Taq-Polymerase zugesetzt wurde und der Ansatz für 8-10 min bei 72 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform zugegeben, um die Polymerase zu extrahieren. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 96 %igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat auf Eis für 15 min gefällt und durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert.

3.2.11 Gerichtete Mutation

Eine DNA-Sequenz konnte durch *in vitro*-Mutagenese gerichtet verändert werden, indem komplementäre Oligonukleotidstränge, die die gewünschte Sequenz enthielten, als Primer für eine PCR eingesetzt wurden. Die gewünschte Mutation, bestehend aus wenigen Nukleotiden, sollte dabei möglichst zentral im Oligonukleotid lokalisiert sein, um eine Anlagerung der Oligonukleotide zu erreichen, obwohl die Sequenz nicht exakt übereinstimmt.

Folgende Bedingungen wurden gewählt:

- 5 µl Pfu-Puffer 5-fach
- 1 µl DNA-Template (500 ng)
- 4 µl Primer antisense (3 mM)
- 4 µl Primer sense (3 mM)
- 1 µl dNTPs long range je 10 mM
- 35 µl H₂O
- 1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

1. Denaturierung: 30 s 95 °C
 2. Denaturierung: 30 s 95 °C
 3. Primer-Anlagerung: 60 s 55 °C
 4. Kettenverlängerung: 120 s pro 1000 bp 72 °C
 5. Kettenverlängerung nach dem letzten Zyklus: 72 °C 10 min
- Anzahl der Zyklen (Punkte 2-4): 16

Nach der PCR wurde der Ansatz mit 20 U des Restriktionsenzym *Dpn I* versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym schneidet zwischen methyliertem

Arginin und Thymin in der häufig vorkommenden Sequenz 5'...GATC...3'. Hierdurch wird mutationstragende DNA selektiert, da Arginin nur in der Template-DNA methyliert vorliegt.

3.2.12 Polymerase-Kettenreaktion für Sequenzierung

Die Sequenzier-PCR wurden in 10 µl-Maßstäben im Biorad-PCR-Gerät durchgeführt. In dünnwandigen Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 0,2 ml Volumen wurden 200 bis 500 ng zu sequenzierende DNA in 4 µl HPLC-H₂O mit 4 µl Primerlösung (3,2 - 10 pmol) und 2 µl BTRRM (Big Dye Terminator Ready Reaction Mix der Firma Applied Biosystem) gegeben.

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

1. Denaturierung: 10 s 96 °C
 2. Denaturierung: 10 s 96 °C
 3. Primer-Anlagerung: 5 s 50 °C
 4. Kettenverlängerung: 240 s 60 °C
 5. Kettenverlängerung nach dem letzten Zyklus: 72 °C 10 min
- Anzahl der Zyklen (Punkte 2-4): 30

Die amplifizierte DNA wurde anschließend durch Ethanol und Natrium-Acetat präzipitiert. Dazu wurde der PCR-Ansatz zu einer Mischung von 90 µl HPLC-H₂O, 250 µl absolutem Alkohol, 2 µl Dextranblau und 10 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4,6) gegeben und sorgfältig auf dem Vortexer gemischt. In 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur präzipitierte die DNA, die durch Zentrifugation für 20 min bei 14.000 Upm vom Überstand getrennt wurde. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 25 µl HPLC-H₂O gelöst. Bis zur Sequenzierung wurde die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

3.3 Biochemische Arbeiten

3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976; mod.)

10 µl Proteinprobe wurden mit 790 µl H₂O und 200 µl Färbereagenz (Fa. Fluka) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min gegen einen Leerwert im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration wurde aus einer mit BSA-Lösung erstellten Eichkurve ermittelt (0,05-2 mg BSA/Ansatz)

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die im Laemmli-Probenpuffer denaturierten Proteinproben wurden im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung und Analyse von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Biorad) im Polyacrylamidgel. Das Trenngel mit je nach Trennleistung benötigtem Acrylamidgehalt wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand 1 mm gefüllt (Tab. 8). Anschließend wurde die Geloberfläche mit Isopropanol überschichtet, um die Ausbildung einer glatten Oberfläche zu gewährleisten. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm, der die Taschen für die Proben ausspartete, luftblasenfrei eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation konnte das Gel in feuchter Verpackung bis zu 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer gespannt und der Laufpuffer in die Elektrodenkammer gefüllt. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde mit 0,2 Volumen 5x Probenpuffer versetzt, zur Denaturierung und Spaltung der Disulfidbrücken 5 min bei 95 °C gekocht und in eine Tasche des Gels gefüllt. Die Elektrophorese wurde für ca. 50 min bei 25 mA pro Gel durchgeführt. Schließlich wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine entweder auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um im Immunoblot spezifisch nachgewiesen werden zu können oder die Gele wurden mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Desweiteren konnten die Gele unter Vakuum und Hitze auf Whatman-Filterpapier getrocknet und zur Autoradiographie radioaktiv markierter Proteine im PhosphoImager exponiert werden.

Tab. 8: SDS-Polyacrylamid-Gelzusammensetzung **a**: Trenngel mit Gesamtvolumen 11 ml, ausreichend für 2 Gele, **b**: Sammelgel: Gesamtvolumen 4 ml, ausreichend für 2 Gele

a: Trenngel	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Tris pH 8,8	5,280 ml	5,280 ml	5,280 ml	5,280 ml
Acrylamid (30%)	2,750 ml	3,660 ml	4,590 ml	5,500 ml
H ₂ O	2,750 ml	1,840 ml	0,910 ml	-
SDS (20 %)	0,055 ml	0,055 ml	0,055 ml	0,055 ml
APS (10 %)	0,110 ml	0,110 ml	0,110 ml	0,110 ml
TEMED (10 %)	0,055 ml	0,055 ml	0,055 ml	0,055 ml
b: Sammelgel	5 %			
Tris pH 8,8	0,800 ml			
Acrylamid (30%)	0,600 ml			
H ₂ O	2,380 ml			
SDS (20 %)	0,040 ml			
APS (10 %)	0,080 ml			
TEMED (10 %)	0,040 ml			

3.3.3 Proteinfärbung im SDS-Gel

Proteine wurden nach der SDS-Gelelektrophorese durch Coomassie Blue Reagenz gefärbt (50 % Methanol [v/v], 10 % Essigsäure [v/v], 0,1 % Coomassie-Brillant-Blau [w/v]). Die Gele wurden zunächst in der Färbelösung schwenkend bei 70 °C für 15 min bewegt. Nach mehrmaliger Inkubation mit Entfärbelösung (10 % Methanol [v/v], 5 % Essigsäure [v/v]) für je 10 min traten die die Proteinbanden deutlich blau gegenüber dem entfärbten Hintergrund hervor. Die Gele wurden kurz in Wasser gespült, mit Hilfe der Kodak Image Station dokumentiert und auf 3M Whatman-Filterpapier im Vakuumgeltrockner getrocknet.

3.3.4 Western Blot

Durch den „semi-dry“ Western Blot wurden Proteine aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm, Schleicher & Schuell, BioScience) im Transblot Semi

Dry Transfer Cell transferiert. Whatman-Filterpapier, mit Methanol/Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) getränkt, Membran und Gel wurden in der Blotkammer luftblasenfrei gestapelt und bei 17 V für 1 h geblottet. Anschließend wurde die Membran in Ponceau S-Färbelösung (0,15 % Ponceau S, 0,5 % (v/v) Eisessig) geschwenkt. Proteine wurden reversibel gefärbt, um den Transfer zu überprüfen. Für weitere Immunoblot-Versuche wurde die Nitrocellulosemembran mit Wasser und PBS vollständig entfärbt. Alternativ zum Proteintransfer wurde das Verfahren des Dot-Blot zum Schnelltest angewendet. Hierbei wurden 20 µl Proteinlösung direkt auf Nitrocellulosemembran getropft, getrocknet und wie der Immunoblot behandelt.

3.3.5 Immunoblot

Für einen spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer unspezifisch abgesättigt, um die unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an die Membran zu minimieren. Die Membran wurde anschließend in TBS-T-Puffer mit spezifischen Antikörpern oder Antiseren unter Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur bzw. für 16 h bei 4 °C inkubiert und anschließend für 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde weiter für 1 h mit dem Zweitantikörper in TBS-T-Puffer inkubiert und anschließend gewaschen. Der Nachweis erfolgte mittels Umsetzung von Femto-Reagenz durch die gekoppelte Peroxidase. Das Chemolumineszenzsignal wurde mit Hilfe der Kodak Image Station dokumentiert. Zur Weiterverwendung der Nitrocellulosemembran konnten durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2 M NaOH die Antikörper entfernt werden, was einen spezifischen Nachweis anderer Proteine auf der Membran durch Antikörper ermöglichte.

3.3.6 Aufreinigung von Toxin A aus *C. difficile* Kulturüberstand

Dem Kulturüberstand von einer *C. difficile*-Kultur (Kap. 3.1.1) wurde 70 % Ammoniumsulfat zugesetzt, was die Proteine innerhalb von 3 h zum Fällern brachte. Das nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 8.000 Upm entstandene Pellet wurde in

10 ml Tris (50 mM, pH 7,5) resuspendiert und gegen 50 mM Tris über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde in der FPLC aufgereinigt. Die mit 50 mM Tris, pH 7,5 äquilibrierte Anionentauschersäule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min beladen und gewaschen. Durch einen angelegten linearen Gradienten mit 50 mM Tris/ 1 M NaCl, pH 7,5 eluierte Toxin A aufgrund der bei pH 7,5 partiellen negativen Ladung bei etwa 250 mM NaCl. Bei etwa 500 mM NaCl eluierte Toxin B, das aufgrund der relativen Reinheit keiner weiteren Aufreinigung bedurfte. Die Toxin A-haltigen Fraktionen wurden anschließend mit Thyreoglobulin weiter gereinigt (Kap. 3.3.7.1).

3.3.7 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Toxin A in *Bacillus megaterium*

Eine Kolonie von pWHtcdA-transformierten *B. megaterium*-Protoplasten wurde über Nacht in 30 ml sterilem LB_{amp}- Medium bei 37 °C und 175 Upm inkubiert. Das gesamte Volumen dieser Vorkultur wurde in 1 l LB_{tet}- Medium überimpft und die Hauptkultur unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,3 erfolgte die Induktion des Xylosepromotors mit 0,1 % Xylose, wodurch die Expression des Toxin A-Gen gestartet wurde. Das Wachstum wurde bis zum Erreichen der stationäre Phase (OD 1,4) kontrolliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 15 ml *B. megaterium*-Lysispuffer resuspendiert und mittels French press bei 1.200 psi aufgeschlossen. DNaseI wurde zugegeben, um die chromosomale DNA zu spalten und die Viskosität des Lysats zu verringern. Die lösliche Fraktion der Zellen wurde durch Zentrifugation bei 15.000 Upm bei 4 °C gewonnen.

3.3.7.1 Affinitätsreinigung von Toxin A durch Thyreoglobulinbindung

Thyreoglobulin bindet Toxin A bei 4 °C. Diese Bindung löst sich bei einer Temperatur von 37 °C. Man nutzt diese Eigenschaft zur Reinigung von Toxin A aus komplexen Proteinlösungen (Krivan und Wilkins, 1987).

Kopplung von Thyreoglobulin an CNBR-Sepharose

800 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden in ein 15 ml Falcon eingewogen und für 15 min in 5 ml 1 mM HCl (pH 3,0) zum Quellen bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Schritte fanden bei 4 °C statt. Das gequollene Gel wurde mit 30 ml 1 mM HCl (pH 3,0) gewaschen. 30 mg Thyreoglobulin wurden in 8 ml Kopplungspuffer gelöst und auf das gequollene Gel gegeben. Im Überkopfschüttler fand über Nacht die Kopplung des Thyreoglobulins an die Sepharose statt. Das Gel wurde in eine PD₁₀-Desalting-Leersäule (Amersham Biosciences) gegeben und mit 50 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zusammen mit 10 ml 200 mM Glycin pH 8,0 wurde die Säule für 1 h im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur geschwenkt. Es folgten 3 Waschzyklen à 30 ml Waschpuffer 1, 3 Waschzyklen à 30 ml Waschpuffer 2 und 1 Waschzyklus mit 10 ml 50 mM HEPES/50 mM NaCl (pH 7,4). Die Säule konnte in PBS mit 0,02 % Na-Azid bei 4 °C gelagert werden, wenn die Säule nicht sofort benötigt wurde.

Bindung und Elution von Toxin A

Vereinigte Fraktionen aus einer FPLC-Aufreinigung (Kap. 3.3.6) bzw. die lösliche Fraktion des *B. megaterium*-Lysat (transformiert mit pWHtcdA, Kap. 3.3.7) wurden rezirkulierend über Nacht über die Thyreoglobulinsäule gegeben. Der Durchlauf der Säule wurde aufgefangen und über SDS-PAGE untersucht. Die Säule wurde bei 4 °C mit 50 ml eiskaltem PBS gewaschen. Zur Elution des gebundenen Toxin A von der Säule wurden 2 ml 37 °C warmes PBS auf die Säule gegeben. Zusätzlich wurde die Säule für 10 min bei 37 °C inkubiert. Mehrere Milliliter PBS wurden auf die Säule gegeben und Fraktionen à 500 µl gesammelt. Über SDS-PAGE wurde die Proteinmenge abgeschätzt und toxinreiche Fraktionen wurden vereinigt, umgepuffert (Kap. 3.3.8) und mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

3.3.7.2 *Ni²⁺-Affinitätsreinigung von rekombinantem, 6xHis-markiertem Toxin A aus B. megaterium-Lysat*

Die lösliche Fraktion einer induzierten 11 Hauptkultur der mit pWHtcdA_{His} transformierten *B. megaterium*-Protoplasten wurde für die FPLC-Reinigung eingesetzt. Die Ni²⁺-Säule, an die Histidin-markierte Proteine binden, wurde von Amersham

Bioscience bezogen (HiTrap™ Chelating HP, 1 ml). Die optimale Flussrate betrug 0,5 ml/min. Der Startpuffer setzte sich aus 20 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄ und 300 mM NaCl (pH 8,0) zusammen.

Das System wurde zunächst mit Startpuffer equilibriert, dann wurde das *B. megaterium*-Lysat auf die Säule gegeben und anschließend mit 30-fachem Säulenvolumen Startpuffer gewaschen. Histidin-markierte Proteine wurden durch 250 mM Imidazol im Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄ und 300 mM NaCl [pH 8,0]) von der Säule verdrängt. Es wurden 500 ml-Fraktionen gesammelt, die in 7 %igem SDS-Gel aufgetrennt und weiter analysiert wurden.

3.3.8 Umpufferung des Toxin A durch PD₁₀-Säulen

Nach der FPLC-Aufreinigung wurde das Toxin A zur Lagerung umpuffert. Dies geschah mit vereinigten Fraktionen hoher Toxinkonzentration bis zu einem maximalen Volumen von 2,5 ml durch PD₁₀-Desalting Säulen (Fa. Amersham Biosciences). Die Umpufferung in NaCl/Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 100 µM MnCl₂ [pH 7,2]) erfolgte mit Hilfe der PD₁₀-Säule nach Angaben des Herstellers. Zur Lagerung des Toxin A bei -80 °C wurde die Toxinlösung mit 20 % (v/v) Glycerin versetzt und aliquotiert.

3.3.9 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die Präzipitation von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Proteinen ermöglicht durch Ausnutzung der Bindungsfähigkeit von GST an Glutathionsepharose eine selektive Anreicherung aus einem komplexen Proteingemisch.

1 l LB Medium wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur von *E. coli*, die mit dem GST-Fusionsprotein-kodierenden Vektor transformiert waren, beimpft. Nach etwa 1 h Inkubation bei 175 Upm und 37 °C erfolgte die Induktion der Expression mit 200 µM IPTG. Die Ernte der Bakterien nach ca. 3 h Expression unter gleichen Inkubationsbedingungen erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 4.000 Upm. Das Pellet wurde in Bakterienlysispuffer (Tab. 7, Kap 2.10) resuspendiert und die Zellen mittels French Press bei 1.000 psi lysiert. Die unlösliche Fraktion wurde durch

Zentrifugation (20 min, 15.000 Upm) vom Lysat abgetrennt. Bei 4 °C im Überkopfschüttler wurde das Fusionsprotein mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) präzipitiert, wobei 600 µl Beadsuspension für das Lysat von 1 l Ausgangskultur eingesetzt wurden. Die Beads wurden 4-fach mit 2 Volumen Lysispuffer gewaschen und 1-fach mit Thrombinspaltpuffer. Die Beads wurden für die Thrombinspaltung in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Die Spaltung des Fusionsproteins zwischen GST und gewünschtem Protein mit Thrombin (ca. 3 U/mg Protein) fand bei Raumtemperatur für 45 min statt. Die Zentrifugation mit 4.000 Upm trennte die GST-Glutathionsepharosebeads ab. Gegebenenfalls wurde die Spaltung ein zweites Mal durchgeführt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Für eine Elution des kompletten Fusionsproteins wurden die beladenen Beads 1 bis 2-mal mit Glutathionelutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) für 5 bis 10 min im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur geschwenkt.

3.3.10 Lysatherstellung von Zellkulturen

Adhärente Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Lysispuffer (PBS, 1 % Triton, 1 mM Natriumvanadat, 100 µM PMSF) versetzt und anschließend mit einem Schaber mechanisch vom Kulturschalenboden gelöst. Die so erhaltene Suspension wurde mit Ultraschall homogenisiert und vor der SDS-Gelelektrophorese zur Abtrennung des Zelldebris für 5 min bei 13.000 Upm bei 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

3.3.11 Nachweis der Glucosyltransferaseaktivität

Die Glucosyltransferaseaktivität des Toxin A wurde mit einer *in vitro* Glucosylierung von rekombinantem RhoA nachgewiesen (Genth et al., 1999). Es wurden 500 ng Toxin zusammen mit rekombinantem RhoA (250 µg) und 0,25 µCi radioaktiv markierter UDP-[¹⁴C]-Glucose in Glucosylierungspuffer (50 mM HEPES [pH 7,4], 100 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Puffer beendet. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-

PAGE wurde das SDS-Gel getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine durch den PhosphoImager (Firma Packard BioScience Company) dokumentiert.

3.3.12 Isolation aktiver Rho-GTPasen (Pull down)

Zur Untersuchung des Gehaltes an aktivem, GTP-gebundenem RhoA bzw. Rac1 in Zellkulturen wurde die Präzipitation mit an Sepharosebeads immobilisierten Effektorregionen von Rhotekin (C21) bzw. der Crib-Domäne (PAK) durchgeführt. Die Effektorregionen C21 für RhoA bzw. PAK für Rac1 wurden als GST-Fusionsproteine rekombinant hergestellt (Kap. 3.3.9) und an Sepharosebeads gekoppelt. Zu untersuchende Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, mit detergentenhaltigem GST-fish-Puffer (Tab. 7) mechanisch vom Kulturschalenboden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Vortexen und die Inkubation auf Eis für 5 min gingen einer Zentrifugation von 4 min bei 13.000 Upm bei 4 °C voraus. Das so erhaltene Zelllysate wurde mit den Beads unter Schwenken bei 4 °C für 45 min inkubiert, anschließend wurden die Beads mit GST-fish-Puffer gewaschen und in der SDS-PAGE und Western Blot Analyse auf Gehalt an präzipitiertem RhoA bzw. Rac1 untersucht.

3.4 Zellkulturtechniken

3.4.1 Zellkultur

HUVEC-c-Zellen

Adhärenente HUVEC-c-Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden von der Firma PromoCell bezogen und in Endothelial SMF-Medium (Fa. Gibco), komplettiert mit 20 ng/ml basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor, 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor, 1 µg/ml Heparin und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert und alle 3-4 Tage passagiert. Der Hersteller garantierte die Homogenität der Zellen bis 10 Passagen. Für die Versuche wurden Zellkulturen mit geringen Passagezahlen eingesetzt, bei denen der Kulturschalenboden zu ca. 70 % bewachsen war.

CaCo-2-Zellen

Es handelt sich bei CaCo-2-Zellen um eine humane, adhärenente intestinale Epithelzelllinie, die bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM, versetzt mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % nicht essentiellen Aminosäuren kultiviert wurde. Die Zellen wurden 2-mal wöchentlich subkultiviert.

CHO-Zellen

CHO-Zellen (C6/2A10)-Zellen sind Ovarzellen des chinesischen Hamsters, die adhärenent wachsen. In Kultur bei 37 °C und 5 % CO₂ war eine Passage 3-mal wöchentlich erforderlich. Das DMEM/HAM'S F-12-Medium wurde mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % Natrium-Pyruvat versetzt.

HT29-Zellen

Die Zellen, isoliert aus humanem Kolon-Adeno-Karzinomgewebe, wurden in Dulbecco's/ F-12 Ham's Medium kultiviert, das mit 1 % Penicillin/ Streptomycin und 10 % FCS supplementiert war. Die Kulturflaschen wurden mit Fibronectin beschichtet, um die Adhärenz der Zellen zu erreichen.

Swiss 3T3-Zellen

Die Mausfibroblasten wurden in Dulbecco's DMEM Medium kultiviert, das mit 1 mM Natrium-Pyruvat, 1 % Penicillin/ Streptomycin und 10 % FCS supplementiert war. 3x wöchentlich wurden die Zellen passagiert.

3.4.2 Zytotoxizitätsnachweis

Die Zytotoxizität der Toxinpräparationen gegenüber kultivierten Zellen ließ sich lichtmikroskopisch überprüfen, da vergiftete Zellen typische morphologische Änderungen zeigen. Das Medium adhärenenter Zellen, die den Zellkulturschalenboden zu etwa 70-80 % bedeckten, wurde mit Toxinkonzentrationen von 100-500 ng/ml versetzt. Die Zytotoxizität zeigte sich durch die Abrundung der Zellen, die, je nach

Konzentration und Aktivität des Toxins sowie nach Art der Zellen, nach ca. 2 h deutlich erkennbar war. Die morphologischen Änderungen der Zellen wurden stündlich mit einer Kamera der Firma Kappa (Kappa Image Base) dokumentiert.

3.4.3 Isolierung von Mitochondrien

Mitochondrien von CHO-6-Zellen wurden durch verschiedene Zentrifugationsschritte nach einem veränderten Protokoll von Perfettini (2002) isoliert. Die Zellen wurden in Sucrose-Puffer vom Zellkulturschalenboden mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden lysiert, indem die Zellsuspension 10-fach durch eine Kanüle (0,8 x 44 mm) gesogen wurde. Das Zellysate wurde bei 500 x g für 5 min zentrifugiert, wodurch größere Zellbestandteile mit Ausnahme der Mitochondrien sedimentierten. Der Überstand wurde anschließend bei 10.000 x g für 30 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit den angereicherten Mitochondrien wurde in Sucrosepuffer aufgenommen. Der Überstand und das Pellet wurden entweder direkt auf Proteinkonzentrationen von 15 mg/ml bzw. 30 mg/ml eingestellt und zur Lokalisationsbestimmung des Cytochrom C in die SDS-PAGE eingesetzt. Für die Untersuchung eines direkten Einflusses der Toxine auf isolierte Mitochondrien wurde die mitochondrienreiche Fraktion mit Toxin versetzt und bei 30 °C für 90 min inkubiert. Nach anschließender erneuter Zentrifugation wurde die Freisetzung von Cytochrom C aus den isolierten Mitochondrien in den Überstand mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen.

3.4.4 DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein hochspezifischer und sensibler Fluoreszenzfarbstoff für DNA. DAPI bindet doppelsträngige DNA und fluoresziert in hellem Blau bei Anregung mit 365 nm im Fluoreszenzmikroskop. 0,1 µg DAPI wurden in 10 ml PBS gelöst auf Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht und dokumentiert.

3.4.5 Rhodamin-Phalloidinfärbung des Aktinzytoskeletts

Die Inaktivierung der Rho-GTPasen durch die Toxine A und B äußert sich morphologisch in einem drastischen Umbau des Aktinzytoskeletts, der sich durch Fluoreszenzmarkierung des Aktins mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgen lässt. Nach mikroskopischer Betrachtung der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Tyrode-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden fixiert, indem sie mit proteinvernetzender, formaldehydhaltiger Fixierlösung (4 % [w/v] Paraformaldehyd, 0,1 % [v/v] Triton X-100, 50 mM NH₄Cl) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit Tyrode-Puffer gewaschen, bevor das Aktinzytoskelett mit 3 U/ml Rhodamin-Phalloidin in Tyrode-Puffer angefärbt wurde. Die Inkubation für 30 min erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch. Erneut wurden die Zellen dreimal mit Tyrode-Puffer gewaschen, ein Tropfen Mowiol wurde auf die Zellen gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die Betrachtung der Objekte erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. (554 nm Anregungswellenlänge, Fluoreszenz-Ausschlussfilter 573 nm)

4 ERGEBNISSE

4.1 Amplifikation des Toxin A-Gens

4.1.1 Aufreinigung der chromosomalen DNA von *C. difficile*

Die chromosomale DNA von *C. difficile* Stamm VPI 10463 wurde aus einer 5 ml Kultur isoliert. Die Abb. 6 zeigt das Laufverhalten der isolierten DNA im Agarosegel. Die DNA wurde zur Amplifikation des chromosomal kodierten Toxin A-Gens eingesetzt.

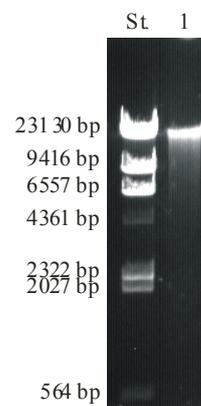


Abb. 6: Chromosomale DNA im Agarosegel (0,7 %ig). Aufgetragen ist 1/10 des Gesamt-DNA-Isolats aus 5 ml Kultur des Stammes VPI 10463 (1). Als Größenstandard dient *Hind* III verdaute Lambda-DNA.

4.1.2 Amplifikation des Toxin A-Gens

Das Gen wurde in drei etwa gleich große Bereiche unterteilt, die separat durch ausgewählte Primerpaare vervielfältigt wurden. Die Primer wurden so gewählt, dass sich die drei entstehenden Abschnitte des Gens überlappen. Das erste Teilstück (*tcdA1*) umfasst die Basen 1 bis 3257 des Toxingens, das mittlere (*tcdA2*) die Sequenz der Basen 1894 bis 5945, der letzte Abschnitt (*tcdA3*) beginnt mit der Base 5539 und endet mit dem der Base 8133. Vor den Anfang des Genabschnitts 1 und an das Ende des Genabschnitts 3 wurden durch die eingesetzten Primer Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Bam*H I integriert (Tab. 9).

Tab. 9: Primerpaare für die Amplifikation des in 3 Bereiche geteilte Toxin A-Gens (*tcdA*)

Bereich des Toxin-Gens		Primersequenz 5'→3'
<i>tcdA1</i> : <i>Bam</i> H I sense	sense	5'-ACGTGGATCC ATG TCT TTA ATA TCT AAA GAA G-3'
<i>tcdA1</i> : 3257-3235	antisense	5'-CCA ACA ATT GAA GCT ACA GTT GC-3'
<i>tcdA2</i> : 1894-1918	sense	5'-GAA TTA AAT AAA TAT AGG ATA CCT G-3'
<i>tcdA2</i> : 5945-5926	antisense	5'-GCA GTG TCA GGA TTG-3'
<i>tcdA3</i> : 5539-5559	sense	5'-GAA TTT AAC TTA GTA ACT GG-3'
<i>tcdA3</i> : <i>Bam</i> H I anti	antisense	5'-ACGTGGATCC TTA GCC ATA TAT CCC AGG-3'

Die Abb. 7 zeigt die PCR-Produkte des *tcdA1*, 2 und 3 im Agarosegel. Die PCR für *tcdA1* und *tcdA2* wurden mit Einsatz der ELT-Polymerase durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.9), die für das *tcdA3* konnte mit Hilfe der pfu-Polymerase durchgeführt werden, die sich durch eine erhöhte proof-reading-Aktivität auszeichnet. Diese verhindert jedoch das Vorhandensein von Adenin-Überhängen an den 3'-Enden des PCR-Produkts, die durch Polymerasen wie Taq oder ELT angefügt werden und die für die Ligation in den pCR2.1TOPO-Vektor des pBAD TOPO TA Expression Kit (Invitrogen) nötig sind. Das *tcdA3*-Fragment wurde deshalb nach der Amplifikation kinasiert, um die beiden flankierenden Adeninbasen zu generieren (Kap. 3.2.10).

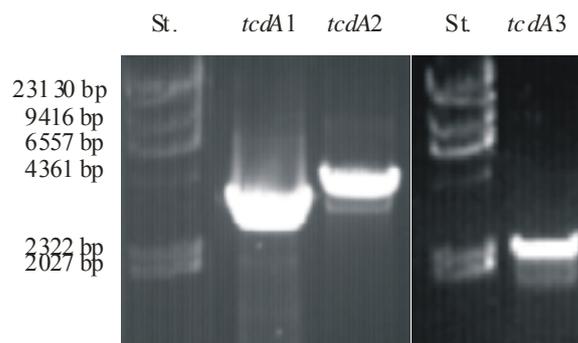
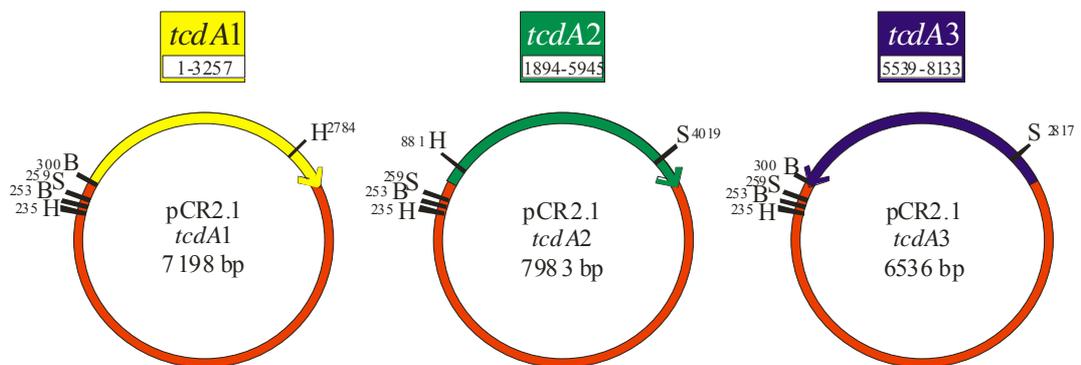


Abb. 7: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte *tcdA1* (1-3257 bp), *tcdA2* (1894-5945 bp) und *tcdA3* (5539-8133 bp) durch Amplifikation der 3 Teilbereiche des Toxin A-Gens. St. *Hind* III-verdaute Lambda-DNA.

4.1.3 Ligation der Toxin A-Gen-Fragmente in pCR2.1 TOPO

Die drei Teilstücke des Toxins wurden jeweils durch das TA-Kloning (Kap. 3.2.8) in den Vektor pCR2.1 TOPO (3931 bp) ligiert. In diesen Vektor ligiert, wurde die Orientierung der integrierten Fragmente *tcdA1*, *tcdA2* und *tcdA3* durch Restriktionsanalyse bestimmt. Das *tcdA3* fügte sich in umgekehrter Orientierung in den Vektor ein, was der Doppelverdau des Vektors pCR2.1 *tcdA3* mit den Restriktionsenzymen *Spe* I und *Bam*H I zeigte (Abb. 8a und b). Die nach dem Verdau erwarteten Größen der Fragmente sind in der Tabelle 10 aufgelistet.

a)



b)

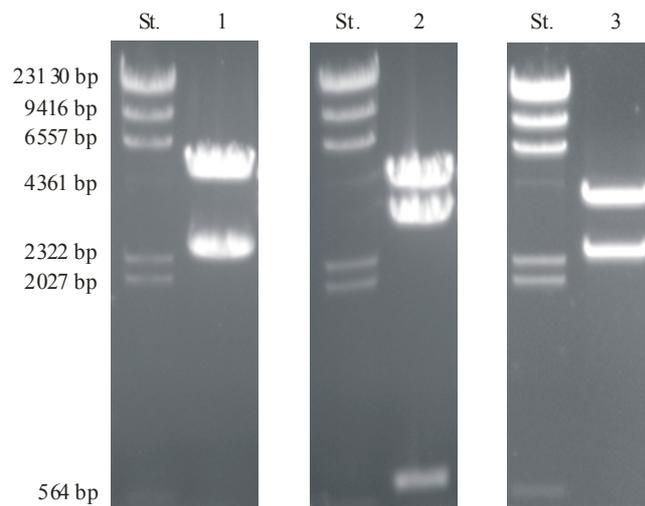


Abb. 8: a) Schematische Darstellung der 3 Vektoren, die aus der Ligation des Vektors pCR2.1 TOPO (rot) mit den 3 amplifizierten Bereichen des Toxin A-Gens generiert wurden. Diese sich überlappenden 3 Genbereiche sind gelb, grün und blau markiert und mit der Anfangs- und Endbasenzahl gekennzeichnet (*tcdA1* von Base 1 bis 3257 des Toxin A, *tcdA2* von Base 1894 bis 5945, *tcdA3* von Base 5539 bis 8133).

B, S und H stellen Schnittstellen der Restriktionsenzyme *BamH* I, *Spe* I, *Hind* III dar, jeweils mit Angabe der Position im Vektor. b) Agarosegelelektrophorese oben genannter Vektoren, pCR2.1 *tcdA1* wurde mit den Restriktionsenzymen *BamH* I und *Hind* III geschnitten (1), pCR2.1 *tcdA2* mit den Enzymen *Hind* III und *Spe* I (2). pCR2.1 *tcdA3* wurde mit *Spe* I und *BamH* I gespalten.

Tab. 10: Fragmentgrößen der durch Restriktionsenzyme geschnittenen Vektor-DNA pCR2.1 *tcdA1*, -2 und -3 bei der Orientierung des Fragments wie in der schematischen Darstellung Abb. 8a angenommen.

	pCR2.1 <i>tcdA1</i>	pCR2.1 <i>tcdA2</i>	pCR2.1 <i>tcdA3</i>
Schnittstellen der Restriktionsenzyme an der Basenposition des Vektors	<i>Hind</i> III 235 <i>BamH</i> I 253 <i>BamH</i> I 300 <i>Hind</i> III 2784	<i>Hind</i> III 235 <i>Spe</i> I 259 <i>Hind</i> III 881 <i>Spe</i> I 4019	<i>BamH</i> I 253 <i>Spe</i> I 259 <i>BamH</i> I 300 <i>Spe</i> I 2817
Durch Verdau sich ergebende DNA-Fragmente (Basen)	4626 2484 47 18	4176 3138 622 24	3949 2517 41 6

Die Genbereiche wurden sequenziert, um während der Amplifikation eventuell entstandene Fehler zu erkennen. Die Sequenzierungen wurden mit 25 unterschiedlichen Primern durchgeführt, die eine Analyse der Gesamtsequenz des Toxin A ermöglichten (Kap. 2.5; die Gesamtsequenz mit Sequenzierprimerangaben befindet sich im Anhang). Die Untersuchung des Klons pCR2.1 *tcdA1* ergab zwei Basen, die sich zur Sequenz des Gens des Stammes VPI 10463 unterschieden. Da diese Mutationen sich bei Expression auf die Aminosäuresequenz ausgewirkt hätten, wurden sie durch 2 Mutations-PCR (Kap. 3.2.11) mit der Notwendigkeit einer Neusequenzierung des Inserts korrigiert. In der Sequenz des *tcdA1* befindet sich eine stille Mutation, die sich nicht bei Expression auf Aminosäureebene zeigt. An Position 831, ausgehend vom Startcodon ATG, ist die Base Guanin zu Adenin mutiert. Das Triplet AAA ist zu AAG verändert, beide Triplets kodieren für die Aminosäure Lysin. Eine zweite stille Mutation befindet sich an Position 3996 im *tcdA2*. Hier kodiert CCG anstelle von CCA (Originalsequenz) für die Aminosäure Prolin. Auch im *tcdA2* konnten zwei Mutationen, die sich bei Expression in der Aminosäureebene gezeigt hätten, durch Mutations-PCR korrigiert werden.

4.1.4 Ligation der Gen-Fragmente zum Toxin A-Gen

Die drei Teilbereiche des Toxin A-Gens überlappen sich, was eine Ligation zum Holotoxin über Restriktionsenzymchnittstellen ermöglichte. Das Ligationsschema ist in Abb. 10 dargestellt. Aus dem Vektor pCR2.1 *tcdA3* wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *Spe* I das letzte Drittel des Toxin A-Gens, ein 2558 bp großer Bereich, mobilisiert. Eine Schnittstelle befand sich im multiplen Klonierungsbereich des Vektors, die zweite innerhalb des *tcdA3*-Gens. Das so erhaltene Fragment wurde aus dem Agarosegel nach der Trennung von dem 3978 bp großen restlichen Vektor isoliert, um es in den Vektor pCR2.1 *tcdA2* ligieren zu können.

Der Vektor pCR2.1 *tcdA2* enthielt ebenfalls zwei *Spe* I-Schnittstellen. Um eine Linearisierung des Vektors durch Verdau mit *Spe* I zu erhalten und eine Mobilisation zu verhindern, war eine vorhergehende Deletion der *Spe* I-Schnittstelle im multiplen Klonierungsbereich des Vektors (Position 259) nötig (646 bp). Dieses gelang durch Verdau des Vektors mit dem Restriktionsenzym *Hind* III und anschließender Religation des Vektors. In Abb. 9 ist in der Spur 1 die Spaltung in zwei Fragmente durch das Enzym im präparativen Gel dargestellt. Die 7337 bp große Bande wurde aus dem Agarosegel geschnitten, extrahiert und religiert. Dieses Plasmid, pCR2.1 *tcdA2*Δ646, ist in Spur 2 der Agarosegel-Abbildung 9 mit *Hind* III linearisiert dargestellt.

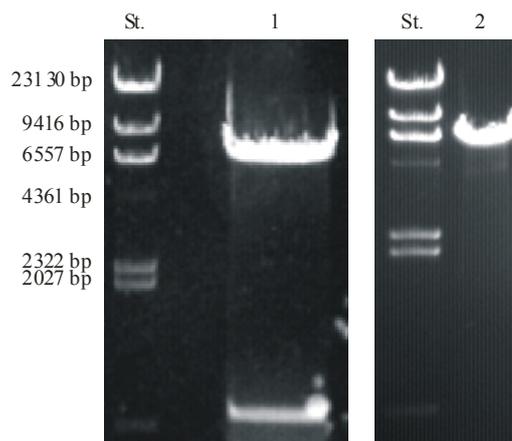


Abb. 9: Deletion der *Spe*I-Schnittstelle im multiplen Klonierungsbereich des pCR2.1 *tcdA2*. Das ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel zeigt die Vektor-DNA pCR2.1 *tcdA* nach Verdau mit *Hind* III in Spur 1. Das 7337 bp große Fragment des mit *Hind* III verdauten Vektors wurde aus dem Gel extrahiert und religiert. Nach Transformation dieses Vektors pCR2.1 *tcdA2*Δ646 in *E. coli* und Plasmidisolierung wurde der Verdau mit *Hind* III wiederholt (Spur 2).

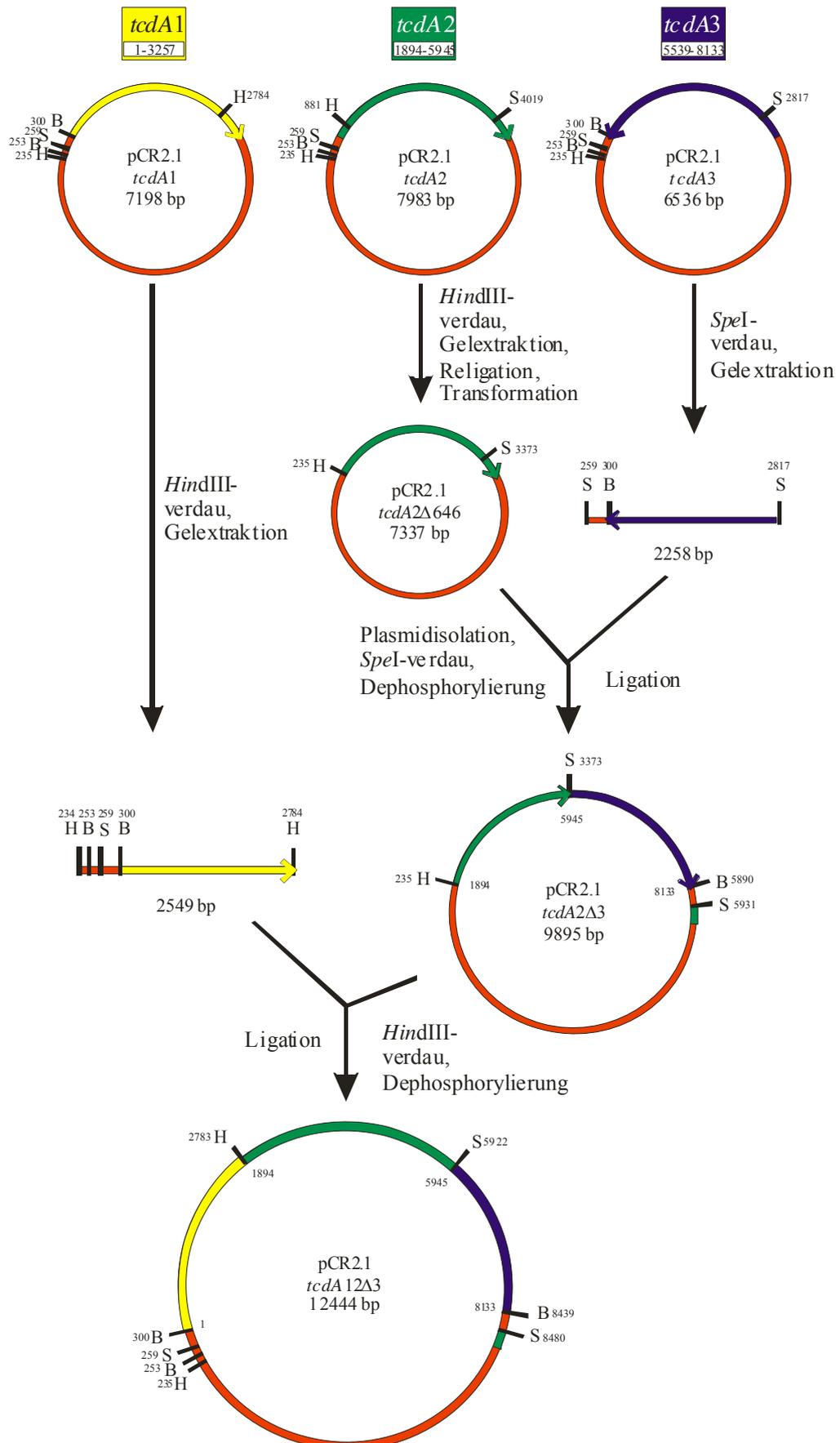


Abb. 10: Ligationsschema. Die Teilstücke *tcdA1*, 2 und 3 des Gens von *C. difficile* Toxin A wurden mittels PCR amplifiziert und durch das TA-Kloning in den Vektor pCR2.1 TOPO ligiert. Der Vektor mit dem *tcdA2* wurde mit *Hind* III geschnitten und religiert, um den so erhaltenen Vektor durch *Spe* I linearisieren zu können. In diesen Vektor wurde ein mit *Spe* I mobilisiertes Teilstück aus *tcdA3* ligiert. Die Vervollständigung des Toxin A-Gens wurde über die Restriktion des Vektors pCR2.1 *tcdA23* mit *Hind* III und anschließender Ligation mit dem mit *Hind* III mobilisierten 5'-Bereich des Toxins aus dem Vektor pCR2.1 *tcdA1* erreicht. Über die mittels PCR zugefügten *Bam*H I-Schnittstellen ist das religierte Gesamt-Gen *tcdA* mobilisierbar. Ergänzend zu dieser Abbildung befinden sich die einzelnen Vektorkarten im Anhang.

Durch die Ligation des Fragments aus dem Vektor pCR2.1 *tcdA3* in den Vektor pCR2.1 *tcdA2Δ646* über die Schnittstelle *Spe* I wurden die beiden letzten Drittel des Toxin A-Gens im Vektor erhalten. Die Orientierung wurde durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*H I, deren Schnittstellen nur einmal im Vektor vorkommen, überprüft. Die Größen der zwei Fragmente entsprachen den erwarteten Größen von 5655 bzw 4240 bp (Abb. 11).

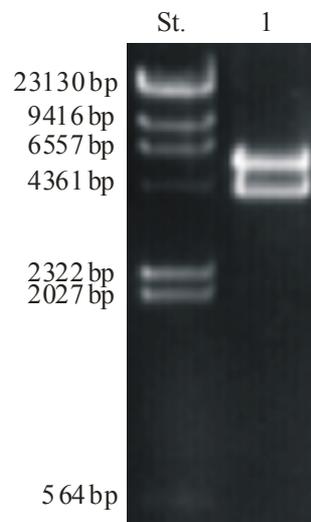


Abb. 11: Überprüfung der Ligation und Orientierung von Doppelverdau des Vektors pCR2.1 *tcdA23* (9895 bp) mit den Restriktionsenzymen *Hind* III (Schnittstelle bei Base 235) und *Bam*H I (Schnittstelle bei Base 5890). Die Fragmente laufen im Agarosegel entsprechend ihrer Größen 5655 bp und 4240 bp (Spur 1), verglichen mit den Fragmenten der *Hind* III-geschnittenen Lambda-DNA.

Um das erste Drittel des Toxin A-Gens in den Vektor pCR2.1 *tcdA23* zu ligieren, d.h. das Holotoxin-Gen zu generieren, wurde zunächst das *tcdA1* mit dem

Restriktionsenzym *Hind* III aus dem Vektor pCR2.1 *tcdA1* mobilisiert. Durch diesen *Hind* III-Verdau befindet sich vor dem Beginn des *tcdA1*-Gens ein Bereich der multiplen Klonierungsstelle des pCR2.1 *tcdA1*, der eine *Bam*H I- sowie eine *Spe* I-Schnittstelle einschließt (vgl. Ligationsschema, Abb. 10). Der Vektor pCR2.1 *tcdA23* wurde mit *Hind* III geöffnet und zur Verhinderung der Selbstligation dephosphoryliert. Durch die Ligation des Fragments aus dem pCR2.1 *tcdA1* in diesen Vektor wurde das Holotoxin-Gen erhalten. Die folgende Abb. 12 zeigt die richtigen Fragmentgrößen 5663 bp, 4223 bp und 2558 bp des erhaltenen Konstrukts pCR2.1 *tcdA123* nach *Spe* I-Verdau nach der Agarosegelelektrophorese.

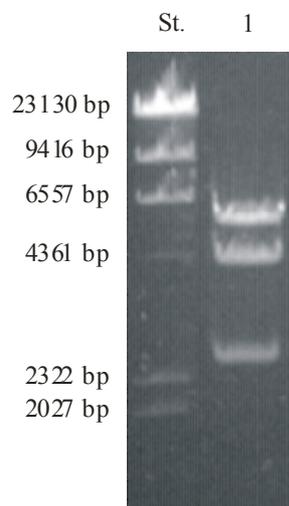


Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung des Vektors pCR2.1 *tcdA123* nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Spe* I. Die Größen der Fragmente zeigen die korrekte Orientierung, mit der das Fragment *tcdA1* in den Vektor pCR2.1 *tcdA23* über die *Hind* III-Schnittstelle ligiert wurde.

4.1.5 Ligation des Toxin A-Gens in den Vektor pWH1520

Die kodierende Sequenz für das Holotoxin TcdA wurde aus dem Konstruktionsvektor pCR2.1 *tcdA123* mit *Bam*H I mobilisiert. Das Fragment wurde mit dem *E. coli* / *B. megaterium*-Shuttle-Vektor pWH1520 (7.929 bp), der mit *Bam*H I linearisiert und dephosphoryliert wurde, ligiert. Die Effizienz dieser Ligation war so gering, dass unter ca. 300 Klonen nur ein positiver Klon erhalten werden konnte, bei dem das Gen in der richtigen Orientierung im Vektor pWH1520 vorlag.

Die Vektor-DNA eines positiven Klons ist in der Abb. 13a) und b) abgebildet. Die Länge des Konstrukts beträgt 16.068 bp, das enthaltene Insert ist 8.139 bp lang. Ein *Bgl* I-Verdau linearisiert den Vektor, die verdaute DNA ist in der Spur 1 des Agarosegels (Abb. 13) gezeigt.

In der Spur 2 ist die *Bam*H I geschnittene DNA aufgetragen, wobei das *tcdA*-Gen durch den Verdau mobilisiert wurde. Insert und Vektor sind mit Längen von 8.139 bp und 7.929 bp nicht deutlich als Doppelbande im Agarosegel zu erkennen. Eine Doppelbande ergab sich durch den *Spe* I-Verdau (Spur 3), durch den die richtige Orientierung des Gens erkennbar wurde; die Fragmente sind 5.829 bzw. 10.239 bp groß.

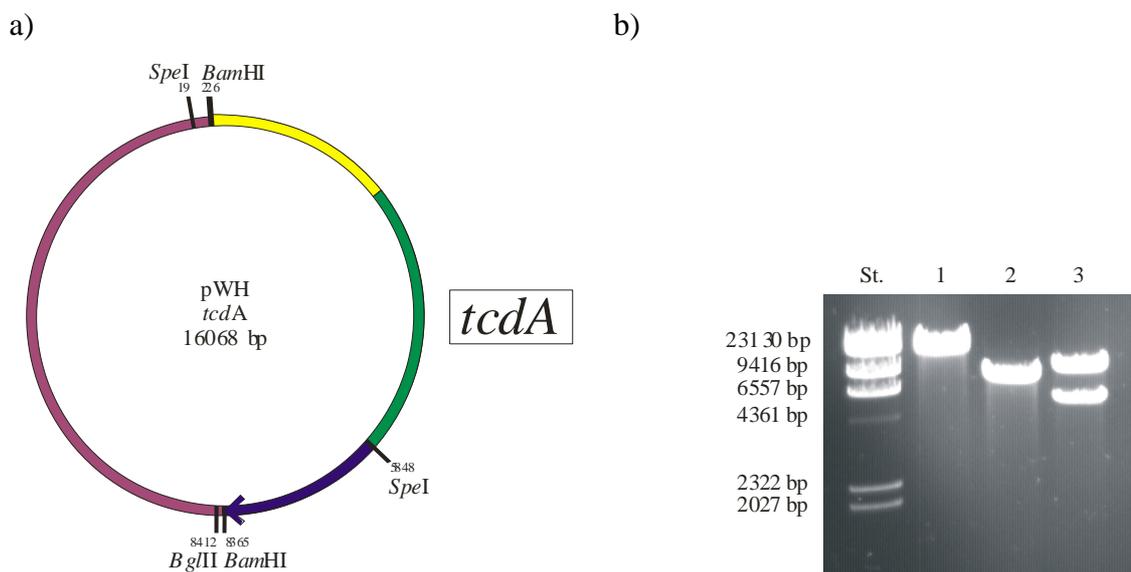


Abb. 13: a) Schematische Darstellung des pWH *tcdA*. In den Vektor pWH1520 (lila) wurde über die *Bam*H I-Schnittstelle das Gen des Toxin A (gelb/grün/blau) ligiert. b) Agarosegelelektrophorese nach Verdau des pWH *tcdA* mit *Bgl* I (Linearisierung 16.068 bp, Spur 1), *Bam*H I (Mobilisierung des *tcdA*-Gens [8.139 bp] aus dem Vektor [7.929 bp], Spur 2) bzw. mit *Spe* I (Orientierung des *tcdA*-Gens im Vektor durch direktionalen Verdau 10.239 bp und 5.829 bp, Spur 3).

4.1.6 Herstellung eines histidinmarkierten Toxin A-Gens

Das gleiche Ligationsschema wie zur Herstellung des pWH *tcdA* wurde zur Generierung eines zweiten Vektors angewendet, bei dessen 3'-Ende vor dem *tcdA*-Stoppkodon 6 Histidin-Aminosäuren kodiert werden. Die Histidinmarkierung ermöglicht die Reinigung des exprimierten Proteins durch Ausnutzung der Bindung von Histidin an

Cobalt oder Nickel-Ionen (Kap. 3.3.7.2). Zur Deletion des Stoppkodons des Toxin A-Gens wurde eine Mutations-PCR mit pCR2.1 *tcdA3* durchgeführt.

Die weiteren Ligationsschritte stimmten mit dem Ligationsschema bis zum Vektor pCR2.1 *tcdA* überein und ergaben den Vektor pCR2.1 *tcdA* ohne Stoppkodon (pCR2.1 *tcdA* oS).

Die Histidintripletts für die 6xHistidinmarkierung und ein Stoppkodon wurden in den Vektor pWH1520 eingefügt, in den das Toxin A-Gen ohne Stoppkodon ligiert werden sollte. Zunächst wurde der Vektor pWH1520 mit den Restriktionsenzymen *Spe* I und *Bam*H I geschnitten und durch Gelextraktion des größeren Fragments vom 207 bp-Fragment getrennt. Eingefügt wurde dann ein kurzes Stück Doppelstrang-DNA, das aus zwei aneinander gelagerten, komplementären Primern bestand und passende Überhänge für eine Ligation in den mit *Spe* I und *Bam*H I geöffneten Vektor aufwies (Abb. 14). Das Annealing der beiden Primer erfolgte in einer Abkühlungsphase des Primergemisches (1:1) von 90 °C bis auf Raumtemperatur. Dieser Ansatz wurde direkt in die Ligation mit dem mit *Spe* I und *Bam*H I geschnittenen, isolierten Vektor eingesetzt.

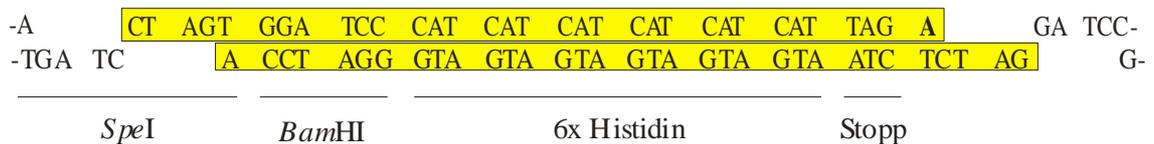


Abb. 14: Veränderung des pWH1520 zum pWHSBH. Sequenz der eingefügten Oligonukleotide (hinterlegt) in den mit *Spe* I und *Bam*H I geöffneten Vektor pWH1520.

In der Sequenz sind eine *Bam*H I-Schnittstelle, 6 Histidine sowie ein Stoppkodon kodiert. Die *Bam*H I-Schnittstelle G-GATCC, über die das Fragment eingefügt wurde, ist nach Ligation nicht mehr vom *Bam*H I-Restriktionsenzym erkennbar, da anstelle des für die Erkennung wichtigen ersten Guanins ein Adenin steht.

In das Leseraster des Toxin A-Gens fügten sich direkt die Tripletts für die 6 Histidine und das Stoppkodon an, mit dem die Expression des Toxin A-Gens mit Histidinmarkierung endet.

4.2 Expression des Toxin A in *B. megaterium*

Die Vektoren pWH *tcdA* bzw. pWHSBH *tcdA_{His}* (kurz pWH *tcdA_{His}*) wurden in *B. megaterium*-Protoplasten transformiert (Kap. 3.1.5). Die Wachstumskurve einer transformierten *B. megaterium*-Kultur ist in der Abb. 15 gezeigt. Die Induktion durch Zugabe von Xylose verzögerte das Wachstum der Kultur nur minimal.

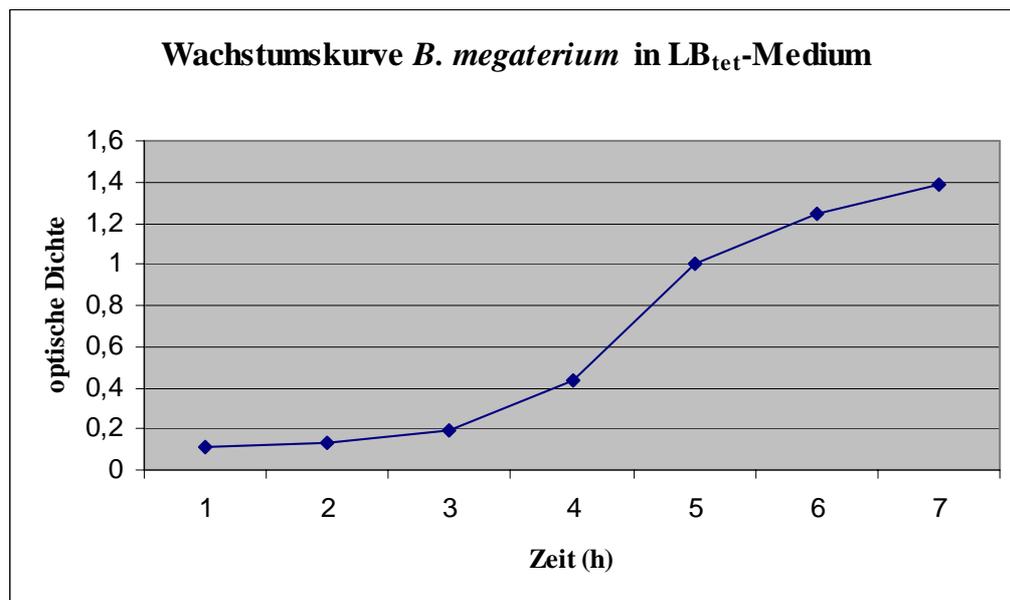


Abb. 15: Wachstumskurve einer nicht induzierten *B. megaterium* pWH *tcdA*-Kultur in LB_{tet}-Flüssigmedium bei 37 °C und 175 Upm, erstellt anhand der optischen Dichte (OD₆₀₀) über die Zeit.

Die Lysate von induzierten und nicht induzierten Kulturen wurden mit SDS-PAGE auf eine Expression von 308 kDa großen Proteinen untersucht. Im Lysat der nicht induzierten Kultur erschien keine zusätzliche Bande im Bereich von 300 kDa Größe gegenüber dem Lysat von Leervektor-transformierter Kultur (Abb. 16, Spur 1,2). Das Lysat der induzierten Kultur lässt schwach eine Proteinbande erkennen, die dem Laufverhalten des Toxin A entspricht. Die Spur 4 der Abbildung 16 zeigt 300 ng Toxin A aus *C. difficile* als Vergleich.

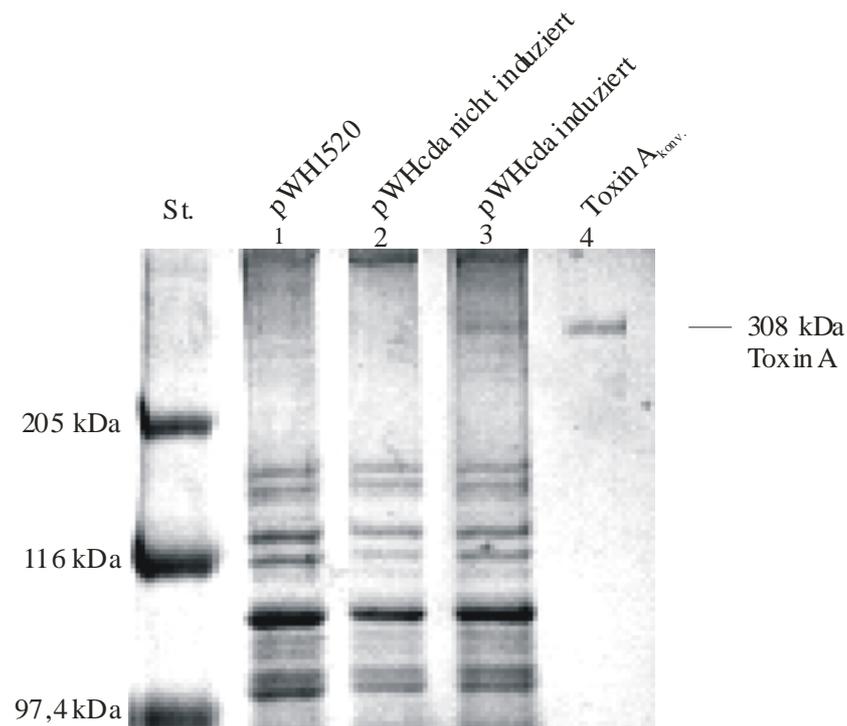


Abb. 16: SDS-Gelelektrophorese der Lysate von *B. megaterium*, transformiert mit Leervektor pWH1520 (Spur 1), pWH *tcDA* induziert (Spur 3) bzw. nicht induziert (Spur 2) entsprechend 100 μ l Ausgangskultur. In Spur 4 sind 400 ng konventionell gereinigtes Toxin A aufgetragen.

Die Expression des Histidin-markierten Toxin A-Gens verlief entsprechend der des nicht markierten Toxin A-Gens (Daten nicht gezeigt).

4.3 Dot Blot-Analyse

Die Erkennung des rekombinanten Toxin A durch Antikörper, generiert gegen konventionell gereinigtes Toxin A, wurde zunächst im Dot-Blot getestet. Sowohl rekombinantes Toxin A und rekombinantes Histidin-markiertes Toxin A als auch konventionell gereinigtes wird im nativen, nicht denaturierten Zustand durch Toxin A-Antikörper spezifisch erkannt. Die Abbildung 17 zeigt diese spezifische Erkennung in Lysaten induzierter *B. megaterium*-Kulturen, sowie Toxin A, gereinigt aus *C. difficile*. Das Lysat nicht induzierter *B. megaterium*-Kultur zeigte kein Signal.



Abb. 17: Dot-Blot mit Antikörpern gerichtet gegen Toxin A. Lysat von *B. megaterium*-Kulturen, transformiert mit pWH *tcdA* bzw. pWH *tcdA*_{His} und durch Xylose induziert. Als Positivkontrolle sind 100 ng konventionell gereinigtes Toxin A aufgetragen. *B. megaterium*-Kulturlysate, transformiert mit pWH *tcdA*, jedoch nicht induziert, ergibt kein Signal.

4.4 Cytotoxizität des Lysats von transformierten *B. megaterium*

Die lösliche Fraktion von *B. megaterium*-Kulturen, die TcdA bzw. TcdA_{His} exprimierten, hatten einen vergleichbar starken, deutlich mikroskopisch sichtbaren Effekt auf die untersuchten eukaryontische Zellkulturen (CaCo 2-, HT 29-, HUVEC-, Swiss 3T3- und CHO 6-Zellen). Die Zellen zeigten die für die Behandlung mit Toxin A typische morphologische Veränderung wie Ausbildung von Retraktionsfasern, Volumenabnahme und Abrundung der Zellen.

In der Abbildung 18 sind HT29-Zellen gezeigt, die im Vergleich mit Lysat, gewonnen aus 0,25 ml induzierter *B. megaterium*-Hauptkultur (1:1 Lysat/ Medium), bzw. mit 100 µg konventionell gereinigtem Toxin A für 3 h behandelt wurden. Die Zellen behielten zunächst Ausläufer, die Retraktionsfasern, die vorübergehend eine spindelförmige Gestalt ermöglichten, bevor die Zellen vollständig abrundeten. Die lösliche Fraktion nicht induzierter *B. megaterium*-Kulturen bewirkte auch nach 24-stündiger Inkubation keine Änderung der Zellmorphologie, was auf die strenge Regulation der Expression durch den induzierbaren Promotor hinweist. Vorinkubation des Lysats mit Antiserum gegen konventionell gereinigtes Toxin A für 30 min bei Raumtemperatur hatte die vollständige Aufhebung der zytotoxischen Wirkung des Toxins zur Folge. Die Antikörper verhinderten die Wirkung sowohl des konventionell gereinigten als auch die des rekombinant gereinigten Toxin A mit und ohne Histidintag (Abb. 18).

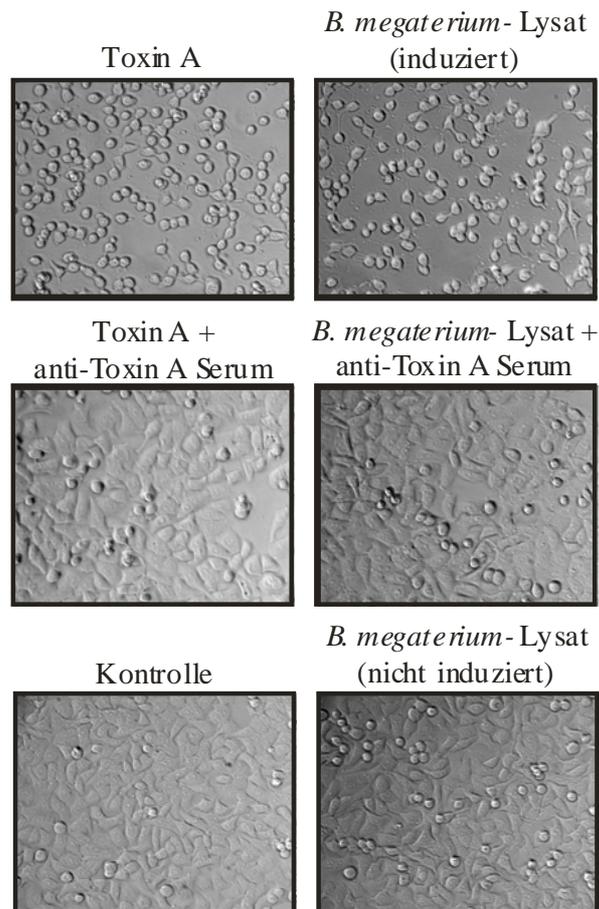


Abb 18: Oben: Behandlung von HT29-Zellen für 3 h mit 100 ng/Kulturschale konventionell gereinigtem Toxin A bzw. mit *B. megaterium*-Lysat, das aus 250 μ l induzierter Kultur gewonnen wurde. Mitte: Die Vorinkubation des Toxin A bzw. des TcdA-haltigen Lysates (TcdA_{His}-Daten nicht gezeigt) mit spezifisch gegen Toxin A gerichteten Antikörper (20 μ l Antiserum, Kaninchen) für 30 min verhindern den zytotoxischen Effekt der konventionellen und rekombinanten Toxine. Unten: HT29-Kontrollzellen bzw. Zellen für 3 h behandelt mit Lysat aus pWH *tcdA*-transformierter, nicht induzierter *B. megaterium*-Kultur.

4.5 Optimierung der Expressionsbedingungen

Um die Expressionsbedingungen zu optimieren, wurde die Expression der mit pWH *tcdA*-transformierten *B. megaterium*-Kulturen bei Raumtemperatur, 29 °C, 32 °C und 37 °C verglichen. Die Expression des *tcdA* war nach der Induktion bis zur beginnenden stationären Phase der Bakterienkultur unabhängig von der Temperatur, die Degradation des exprimierten Toxin A nahm jedoch mit steigender Dauer der Expression deutlich zu. Die Expressionsdauer zwischen Induktion und Ernte bei 37 °C betrug ca. 4 h, bei Raumtemperatur wurde diese optische Dichte erst nach

Inkubationszeit von 10 h erreicht. Die Auswirkungen der Lysate von *B. megaterium* auf die Morphologie von HT 29-Zellen waren, optisch verglichen, am deutlichsten, wurden die *B. megaterium*-Kulturen bei 175 rpm und 29 °C bis 37 °C inkubiert, bei der OD von 0,3 induziert und bei OD 1,4 geerntet.

4.6 *Aufreinigung des rekombinanten Toxin A*

4.6.1 *Aufreinigung durch Thyreoglobulinbindung*

Die charakteristische Bindung von Toxin A an Thyreoglobulin gibt neben der Möglichkeit einer Affinitätsreinigung auch den Nachweis der korrekten Faltung der Rezeptorbindedomäne des rekombinanten Toxins. Das Toxin wurde durch die Bindung an Thyreoglobulin aus dem Lysat von *B. megaterium* spezifisch aufgereinigt. Die Abb. 19 zeigt in einem Immunoblot mit Antikörpern gegen Toxin A die Abreicherung des Toxins aus dem Lysat bzw. die Anreicherung in den eluierten Fraktionen. Der Toxin A-Antikörper erkannte neben dem Holotoxin auch Abbauprodukte, die durch die Temperaturanhebung auf 37 °C trotz Zusatz von Proteaseinhibitoren vermehrt entstanden. Die Degradation in nahezu gleiche Fragmente fand auch bei der Positivkontrolle statt, das konventionell gereinigte Toxin wurde bereits 2-fach von -20 °C auf Raumtemperatur gebracht.

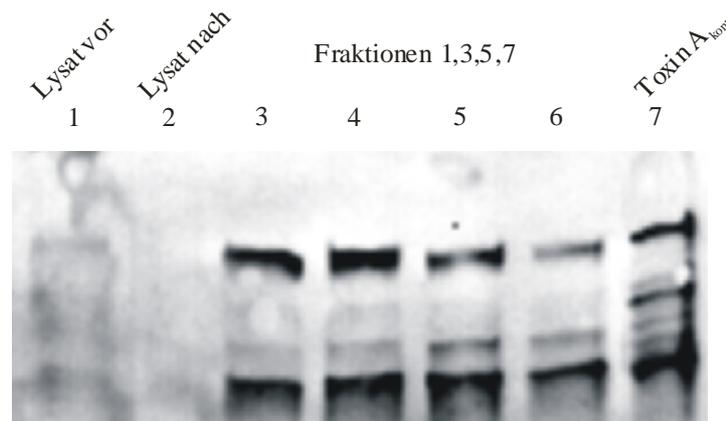


Abb. 19: Western Blot einer Thyreoglobulin-Affinitätsreinigung von Toxin A aus Lysat von *B. megaterium*. In der Spur 1 sind 20 µl Lysat, entsprechend 100 µl Ausgangskultur aufgetrennt, die gleiche Menge Lysat ist in der Spur 2 nach der Bindung des enthaltenen Toxin A an Thyreoglobulin aufgetrennt. Das Toxin ist angereichert sichtbar in den Spuren 3-6, die 20 µl der gesammelten 500 µl Fraktionen 1, 3, 5 bzw. 7 enthalten.

Der Ertrag an Toxin A, der durch die Thyreoglobulinaufreinigung erhalten werden konnte, lag bei 150 µg pro Liter *B. megaterium*-Kultur, bestimmt mit der Bradford-Methode. Um der Degradation des Toxins entgegenzuwirken und keine Fragmente durch eine Reinigung anzureichern, wurde folgende Aufreinigungsmethode mit dem Konstrukt aus dem Vektor pWH *tcdA_{His}* durch Ausnutzung der Bindung der Histidinmarkierung an Nickel bevorzugt (Kap. 4.6.2).

4.6.2 Ni^{2+} -Affinitätsreinigung

Das 6x Histidin-markierte Toxin A, exprimiert aus dem Vektor pWH *tcdA_{His}* in *B. megaterium*, wurde durch reversible Bindung an eine Nickel-Säule gereinigt. Toxinfragmente, die nicht vollständig exprimiert wurden, konnten durch die fehlende C-terminale Histidinmarkierung von der Anreicherung ausgeschlossen werden. In der Abb. 20 ist das coomassiegefärbte Gel mit Proben der Aufreinigungsschritte dargestellt. Im Lysat ist die in der Größe dem Toxin A entsprechende Proteinbande zu erkennen. Das Protein konnte durch die Nickelsäule quantitativ gebunden werden, Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht banden im Gegensatz zu diesem ca. 300 kDa großen Protein nicht an die Säule, was in der Waschfraktion 5 erkennbar ist. Mit Beginn der Elution durch den Imidazol-Stufengradienten, der ab Fraktion 14 gesammelt wurde, tritt die gereinigte TcdA_{His}-Bande in Höhe des Molekulargewichtes von ca. 300 kDa auf (Abb. 20). Etwa 500 µg rekombinantes, Histidin-markiertes Toxin A konnten durch die Nickelaufreinigung aus einem Liter *B. megaterium*-Kultur gewonnen werden.

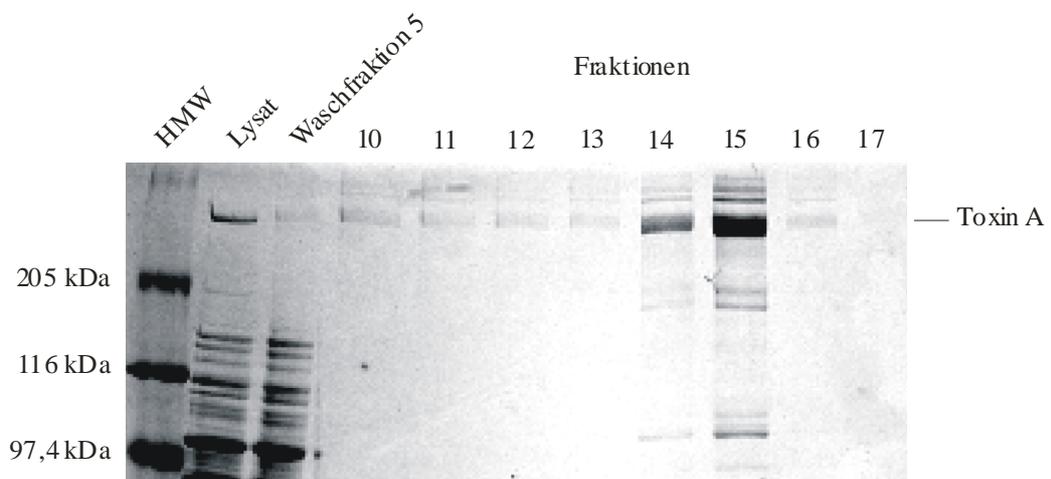


Abb. 20: Coomassiegefärbtes SDS-Gel. Aufgetragen sind neben 5 µl krudem *B. megaterium*-Lysat die 5. Waschfraktion der Nickelsäule, sowie je 20 µl der 500 µl-Fractionen 10 bis 17, Elution mit Imidazol ab Fraktion 14.

Die Abb. 21 zeigt den Nachweis von Toxin A und der Histidinmarkierung des Toxin A in der Western Blot-Analyse. Das Histidin-markierte Toxin A im *B. megaterium*-Lysat wird sowohl durch anti-Toxin A-Serum als auch durch anti-6x Histidin-Antikörper erkannt. Im Durchfluss der Säule konnte kein Toxin nachgewiesen werden, was eine quantitative Abreicherung deutlich macht. Die Fraktion 4 des Eluates von der Nickelsäule enthält angereichertes Toxin A. Konventionell gereinigtes Toxin A als Kontrolle (Spur 4) wird von anti-Toxin A-Serum, nicht aber von anti-6x Histidin-Antikörpern erkannt. Banden von Proteinen mit kleinerem Molekulargewicht (ca. 240 kDa) lassen erkennen, dass Fragmente des Toxins gleichfalls aufgereinigt werden. Da die Fragmente durch die Nickelsäule affinitätsgereinigt wurden und insbesondere im anti-6x Histidinnachweis spezifisch erkannt wurden, liegt bei den Fragmenten eine N-terminale Verkürzung (Abbau) des Proteins vor.

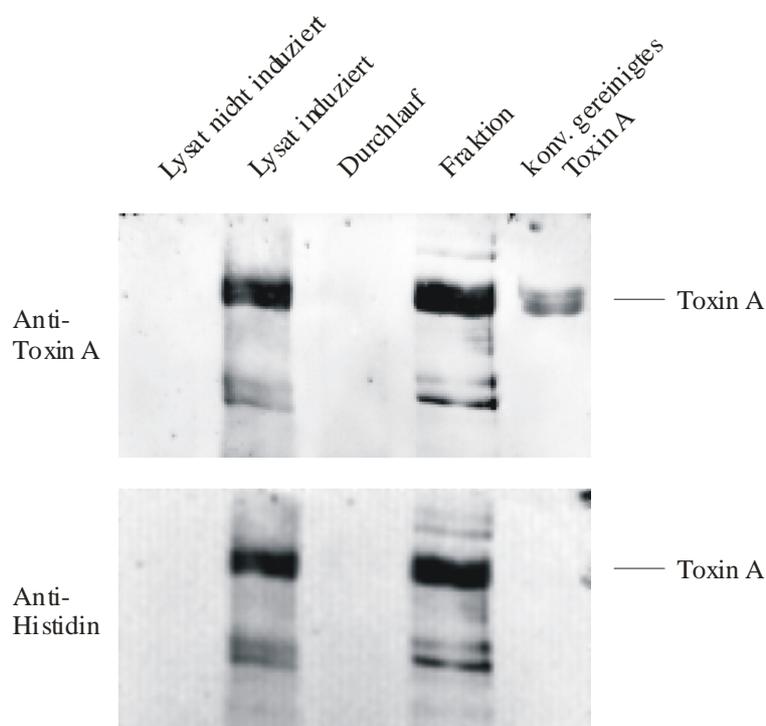


Abb. 21: Western Blot-Analyse des über die Nickelsäule in der FPLC gereinigten Proteins. Oben: Western Blot mit Antiserum gerichtet gegen Toxin A. Je 5 µl Lysat von *B. megaterium* (1: nicht

induziert, 2: induziert mit Xylose) sind aufgetragen. 20 μ l Waschfraktion der Nickelsäule nach Beladung mit Lysat (Durchlauf, 3) und Elutionsfraktion (4). Als Positivkontrolle dienen 100 ng konventionell gereinigtes Toxin A. Unten: Dieselbe Membran wurde mit Antikörpern gerichtet gegen die Histidinmarkierung von Proteinen inkubiert.

4.7 Funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Toxin A

4.7.1 Zytotoxizität des gereinigten Toxin A mit His-Markierung

Im Zytotoxizitätstest wurden die morphologischen Änderungen der Zellen durch die Behandlung mit Toxin A deutlich. 500 ng/ml über die Nickelsäule gereinigtes Toxin A und die gleiche Menge rekombinantes Toxin ohne Histidinmarkierung bewirkten bei Behandlung von HUVEC-, CaCo-2 und CHO-6 Zellen die gleichen deutlichen morphologischen Änderungen in der gleichen Zeit. Die Abbildung 22 zeigt die Zellen nach 3 h Inkubation mit dem Toxin.

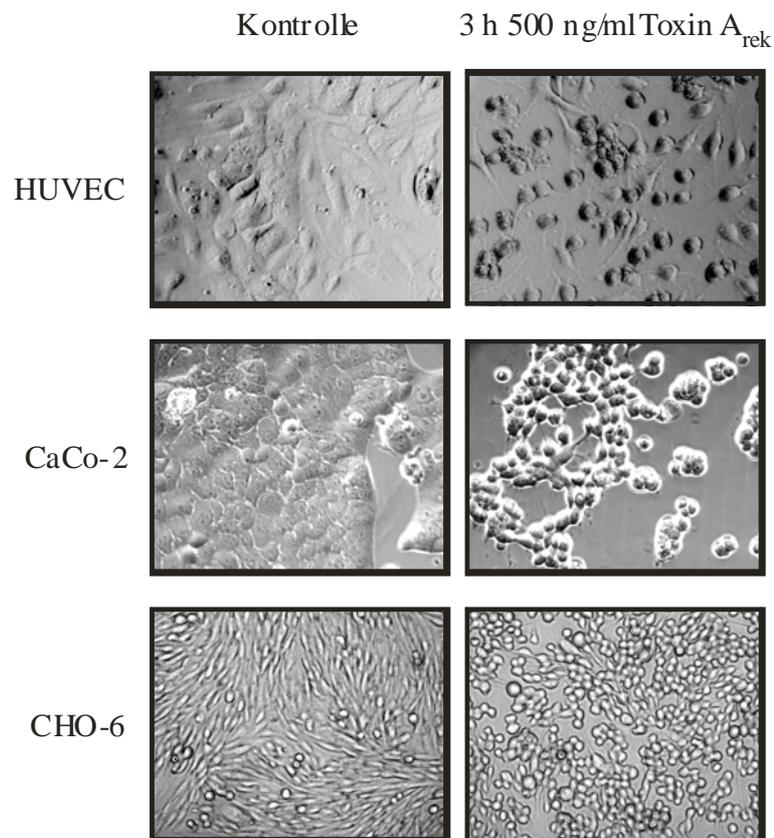


Abb. 22: Zellmorphologische Änderungen von HUVEC-, CaCo-2 bzw CHO-6 Zellen durch Behandlung mit 500 ng/ml aufgereinigtem, histidinmarkiertem Toxin A (TcdA_{His}) für 3 h.

Auch im Vergleich des Histidin-markierten Toxins zum konventionell gereinigten Toxin zeigten CHO-Zellen bei Behandlung mit gleichen Toxinkonzentrationen die gleiche Zytotoxizität (Abb. 23).

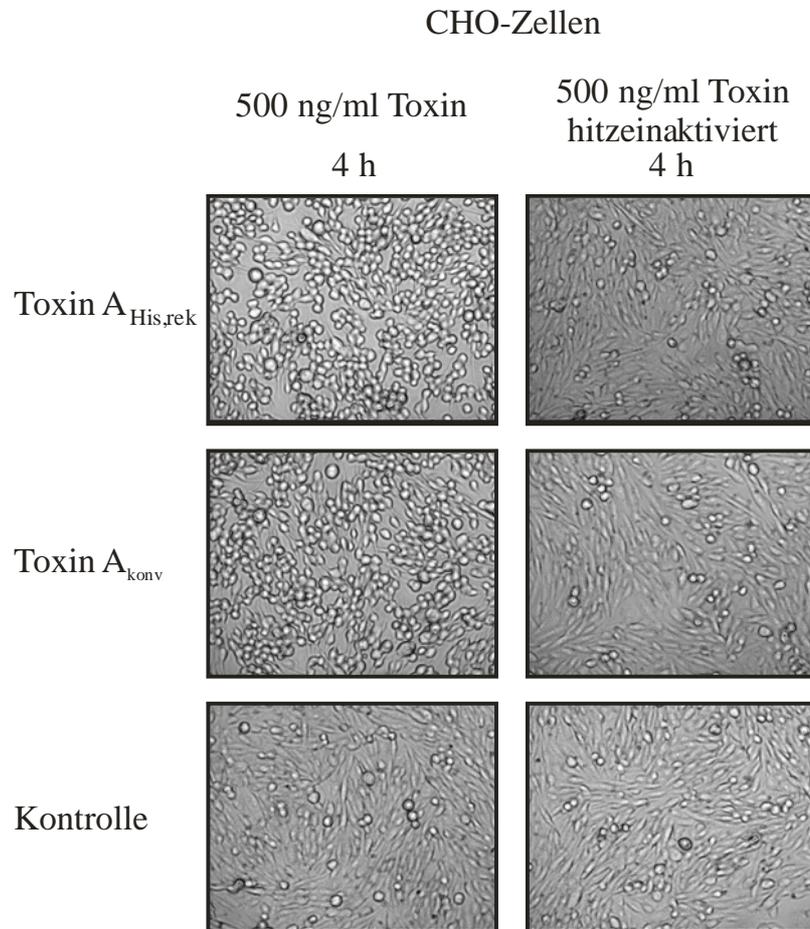


Abb. 23: Zytotoxizitätsvergleich von rekombinantem Toxin A_{His} zu konventionell gereinigtem Toxin A. CHO-Zellen wurden für 4 h mit 500 ng/ml Toxin A behandelt. Unbehandelte Zellen bzw. Zellen mit hitzeinaktivierten Toxinen dienten als Negativkontrolle.

Die Färbung von Zellen mit Rhodamin-Phalloidin macht die Wirkung des Toxins auf das Aktinzytoskeletts der Zellen deutlich. Während bei den unbehandelten Zellen die Gestalt durch das Zytoskelett aufrechterhalten wird und Aktinkabel die gesamte Zelle durchspannen, ist das gefärbte Aktin bei den vergifteten Zellen nur um den Zellkern lokalisiert zu erkennen, wenige Aktinkabel formieren sich zu den sogenannten Retentionsfasern. Die Durchlichtaufnahme zeigt die dadurch spindelförmig wirkende Gestalt der in der Abb. 24 gezeigten Swiss 3T3-Zellen.

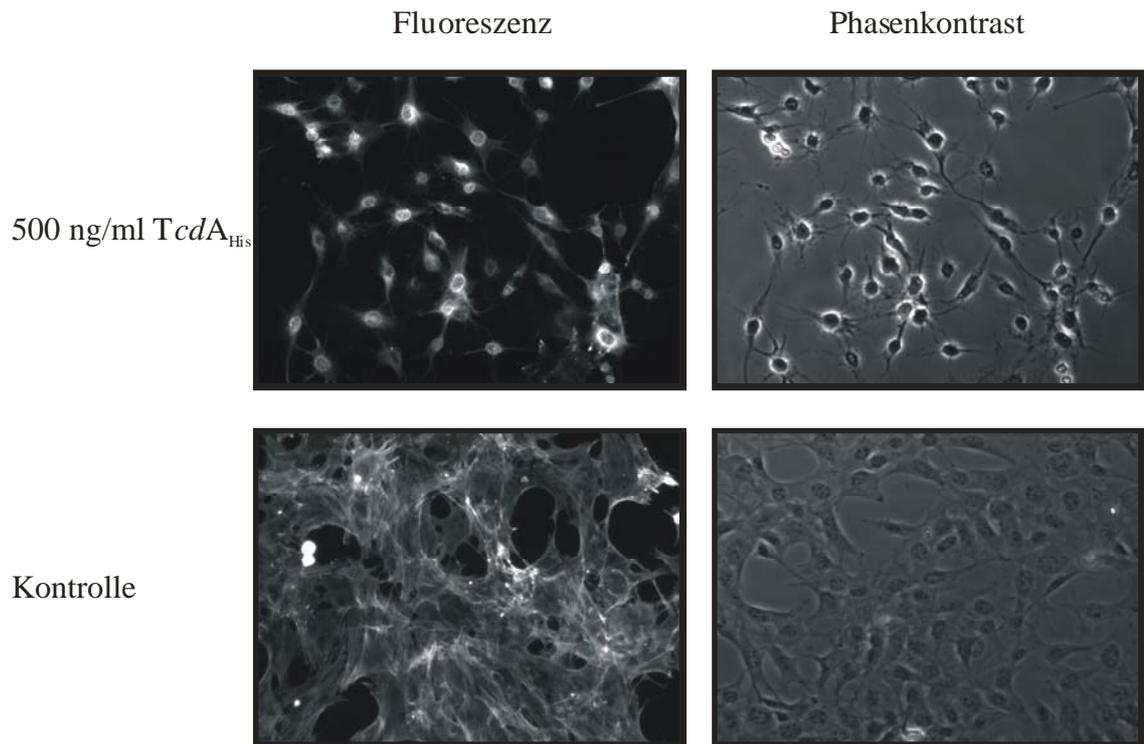


Abb. 24: Rhodamin-Phalloidin-Färbung von Swiss 3T3-Zellen. Die Zellen wurden mit 500 ng/ml rekombinalem Toxin A_{His} für 2 h vergiftet, das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin anschließend gefärbt und mit Fluoreszenzlicht einer Wellenlänge von 554 nm sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienen nicht vergiftete Zellen. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt die Ansicht der Zellen im Phasenkontrast.

4.7.2 Glucosyltransferaseaktivität

Neben der Zytotoxizität wurde als weiterer funktioneller Parameter die Glucosyltransferaseaktivität des histidinmarkierten Proteins mit der des konventionell gereinigten Toxin A vergleichend untersucht. Die Glucosyltransferaseaktivität gibt einen Hinweis auf die korrekte Faltung des Proteins, vor allem der aminoterminalen katalytischen Domäne. Durch die Glucosyltransferaseaktivität des Toxin A wird ein Glucoserest von dem Kosubstrat UDP-Glucose auf eine GTPase wie Rho, Rac oder Cdc42 übertragen (Kap.1.3.2 und 3.3.11). Für die Reaktionen *in vitro* wurden 500 ng Toxin A, 250 ng rekombinantes RhoA zusammen mit radioaktiv markierter UDP-[¹⁴C]-Glucose eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und dessen Exposition auf strahlungssensitiver Folie zeigte die zeitabhängige Glucosylierung der RhoA-Proteine sowohl durch konventionell gereinigtes als auch durch das histidingekoppelte, rekombinante Toxin A (Abb. 25 a).

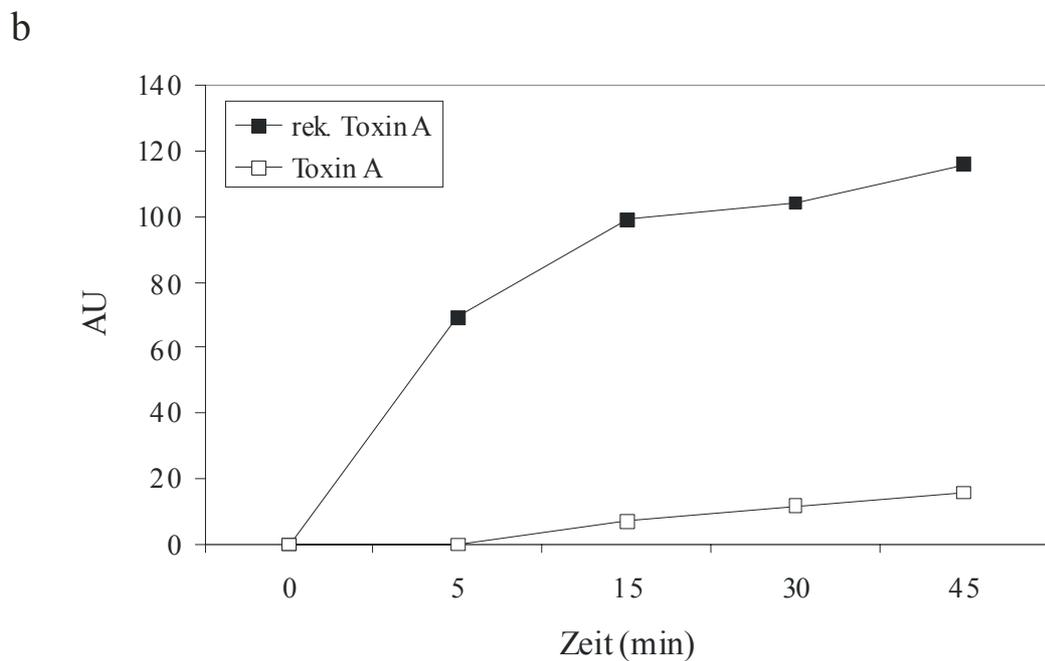
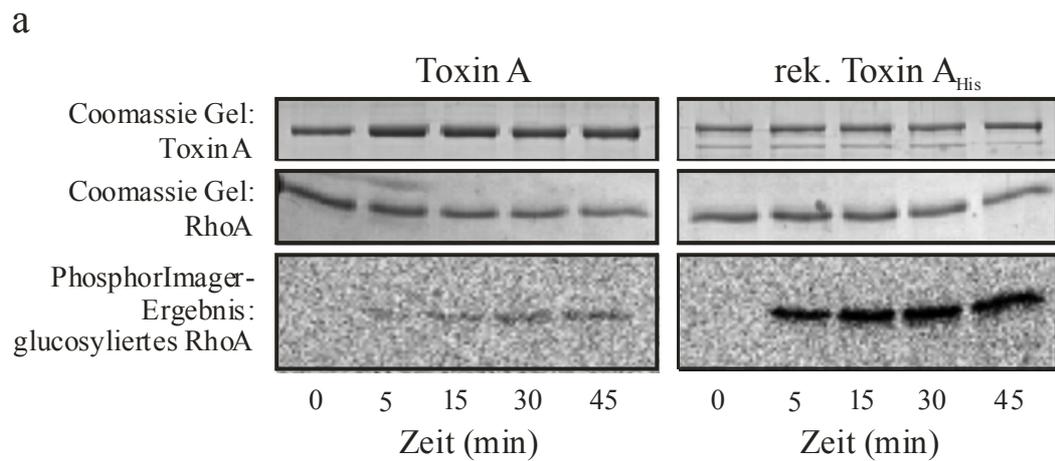


Abb. 25: a) Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel zeigt die *in-vitro* Glucosyltransferaseaktivität der eingesetzten Toxine, konventionell gereinigtes Toxin A (links) und rekombinantes, histidinmarkiertes Toxin A (rechts). Die Autoradiographie zeigt die Glucosylierung der Rho-Proteine mit UDP- ^{14}C -Glucose über die Zeit. Die quantitative Auswertung der Glucosylierungsreaktion durch rekombinantes Toxin A_{His} (■) bzw. Toxin A clostridialen Ursprungs (□) ist in b durch die Intensitäten der Signale der Autoradiographie gegen die Zeit dargestellt.

Die Intensitäten der Signale machen deutlich, dass das rekombinante Toxin A bei gleicher Konzentration im Vergleich zum konventionell gereinigten bereits innerhalb von 5 min deutlich mehr radioaktiv markierte Glucose auf RhoA übertragen konnte. Als Kurve in Abb. 25 b dargestellt, zeigen die Intensitäten nur durch rekombinantes Toxin A eine Sättigung der Glucosylierung des RhoA, die durch konventionell

gereinigtes Toxin A in dem gemessenen Zeitraum nicht erreicht wurde. Die Glucosyltransferaseaktivität des rekombinant gewonnenen Toxin A ist im *in vitro*-Versuch etwa um den Faktor 10 potenter als die des konventionell gereinigten Toxins. Auch hier wurden frisch isolierte Toxine, die nicht tiefgekühlt gelagert wurden, verwendet.

4.8 Untersuchung der apoptotischen Wirkung des Toxin A auf Zellen

Die mehrfach beschriebene apoptotische Wirkung von Toxin A (Liu et al., 2000, He et al., 2002, Brito et al., 2002) wurde sowohl durch die DAPI-Färbung als auch durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien vergifteter Zellen überprüft.

4.8.1 DAPI-Färbung der DNA in Toxin A-behandelten Zellen

In apoptotischen Zellen wird die DNA durch DNasen fragmentiert. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich an fragmentierte, doppelsträngige DNA. CHO-6-Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 48 h mit 500 ng/ml rekombinatem Toxin A behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit DAPI gefärbt, um eine Apoptose nachzuweisen. Vermehrt positiv gefärbte Zellen mit fragmentierter DNA zeigten sich im Vergleich zu Kontrollzellen mit zunehmender Dauer der Toxinbehandlung, jedoch erst nach einer Vergiftungsdauer von 24 h, während die morphologischen Vergiftungszeichen bereits nach weniger als 3 h abgeschlossen schienen (Abb. 26).

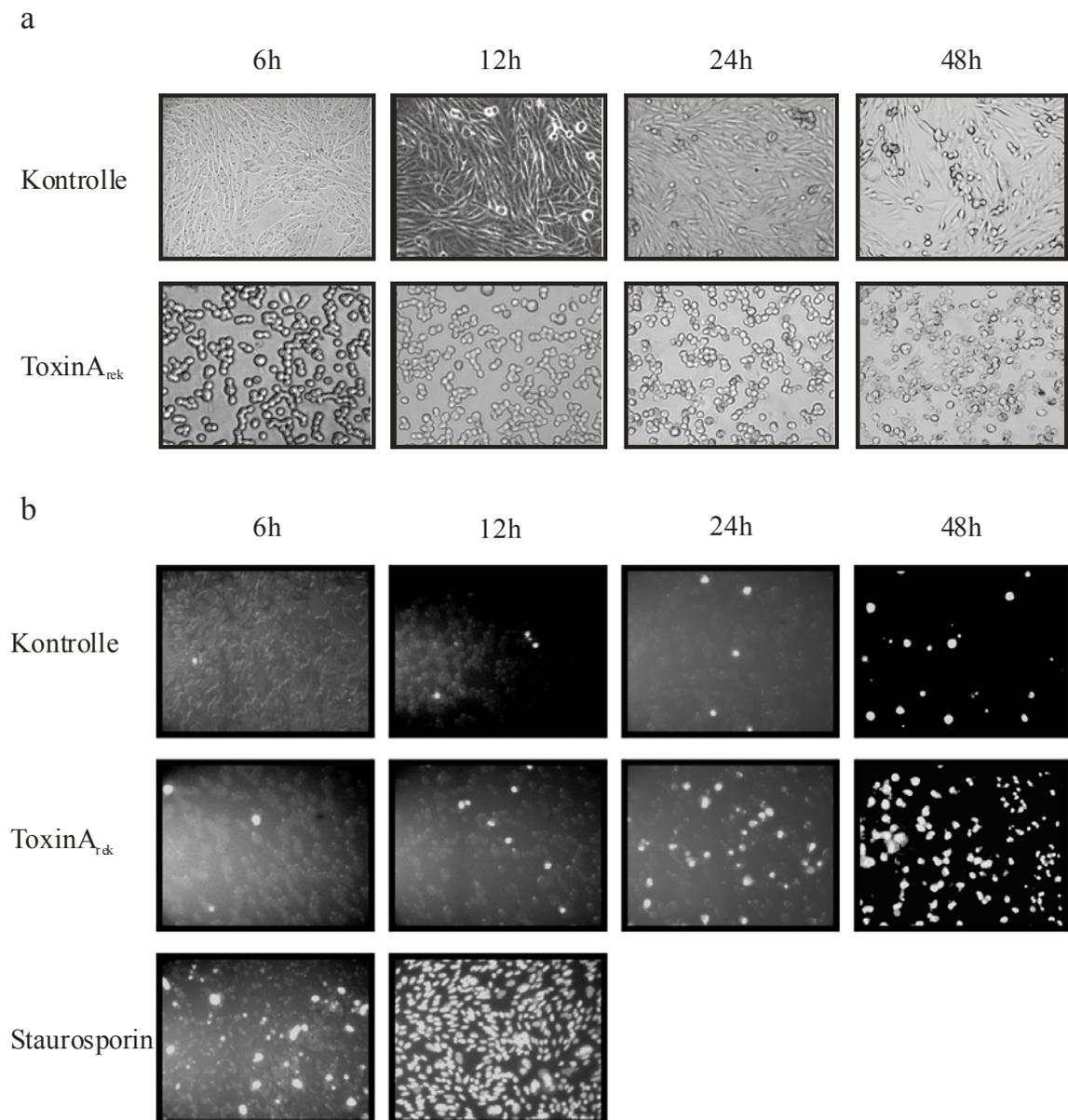


Abb. 26: CHO-6-Zellen wurden bis zu 48 h mit 500 ng/ml rekombinarem Toxin A vergiftet (a) und anschließend einer DAPI-Reagenz-Färbung unterzogen (b). Zellen wurden als Positivkontrolle der DNA-Fragmentierung durch Apoptose mit Staurosporin behandelt. Die Dokumentation zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

4.8.2 Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien durch Toxin A

He und Mitarbeiter beschrieben, dass Toxin A durch eine Schädigung der Mitochondrien die Apoptose einleitet (He et al., 2000). Die Toxin-Wirkung auf Mitochondrien wurde als Glucosyltransferase-unabhängig beschrieben und an isolierten

Mitochondrien überprüft. Die postulierte Glucosyltransferase-unabhängige Wirkung des Toxins sollte zur Charakterisierung des rekombinanten Toxins im Vergleich zum konventionellen Toxin A genutzt werden. Mitochondrienreiche bzw. zytosolische Fraktionen von CHO-6-Zellen, die über einen Zeitraum von bis zu 48 h mit 500 ng/ml rekombinatem Toxin A vergiftet wurden, wurden mittels einer SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf eine Cytochrom C-Freisetzung untersucht. Die Abb. 30 zeigt den Gehalt an Cytochrom C in Mitochondrien bzw. im Zytosol durch den Western Blot. Es konnte bis zu 24 h keine deutliche Veränderung des Gehaltes an Cytochrom C in den Mitochondrien vergifteter CHO-6-Zellen sowie vergifteter CaCo-2-Zellen bestätigt werden. Auch mit einer 10-fach erhöhten Toxinkonzentration konnte keine Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol innerhalb einer Stunde nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein Übergang des Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol konnte bei primär kultivierten HUVEC-Zellen gezeigt werden. Der Effekt zeigte sich jedoch erst ab einer Inkubationszeit von frühestens 24 h (Abb. 27).

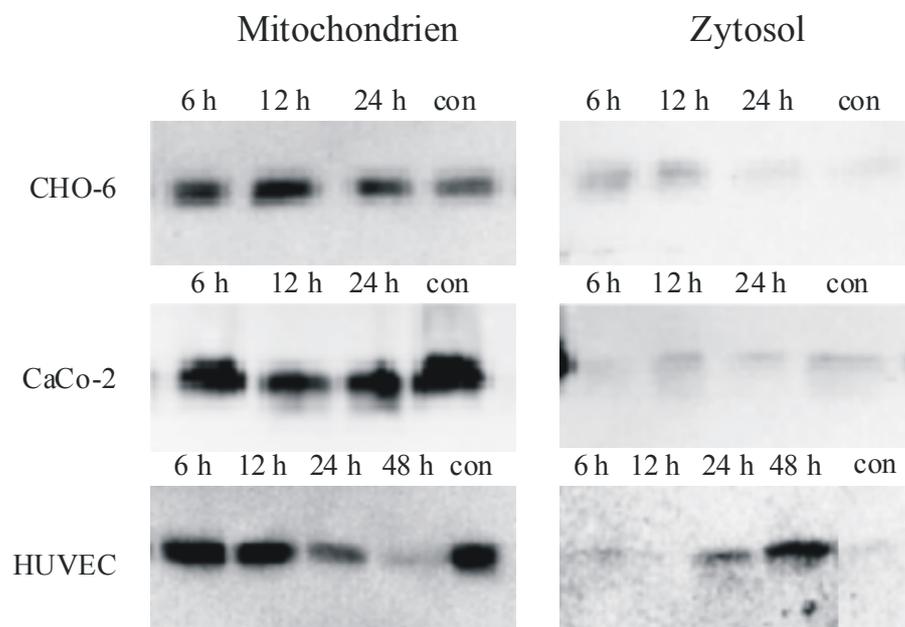


Abb. 27: Zeitabhängige Cytochrom C-Freisetzung nach Intoxikation von CHO-6-, CaCo-2- bzw. HUVEC-Zellen mit 500 ng/ml rekombinatem Toxin A, dargestellt im Western Blot mit Antikörpern gegen Cytochrom C. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollzellen.

He et al. postulierten einen direkten Effekt von Toxin A auf Mitochondrien. Um dies zu überprüfen wurden Mitochondrien aus CHO-6-Zellen isoliert und mit unterschiedlichen Toxin-Präparationen inkubiert. Als Positivkontrolle diente 0,01 % SDS, welches zu einer Durchlässigkeit der Mitochondrienmembranen für das Cytochrom C führte und das Cytochrom C in den Überstand diffundieren ließ. Die Inkubation von isolierten Mitochondrien mit 5 µg/ml rekombinantem Toxin A für 1,5 h hatte keinerlei Effekt auf die Mitochondrien. Es konnte kein Cytochrom C im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 3). Die Inkubation von isolierten Mitochondrien mit konventionell gereinigtem Toxin bewirkte eine partielle Cytochrom C-Freisetzung und die Inkubation mit krudem Toxin A, d.h. lediglich über eine Ionenaustausch-Chromatographie angereichertes Toxin A hatte zur Folge, dass die Mitochondrien vollständig für Cytochrom C durchlässig wurden (Spur 5). Eine Hitzebehandlung der kruden Toxin A-Präparation für 5 min bei 95 °C hatte den Verlust der Mitochondrien-Permeabilisierung zur Folge (Spur 7). Die Schädigung der Mitochondrien ist somit nicht auf das Toxin A sondern auf einen zusätzlichen Faktor zurückzuführen, der durch die Reinigung des konventionellen Toxins nicht vollständig abgetrennt wurde.

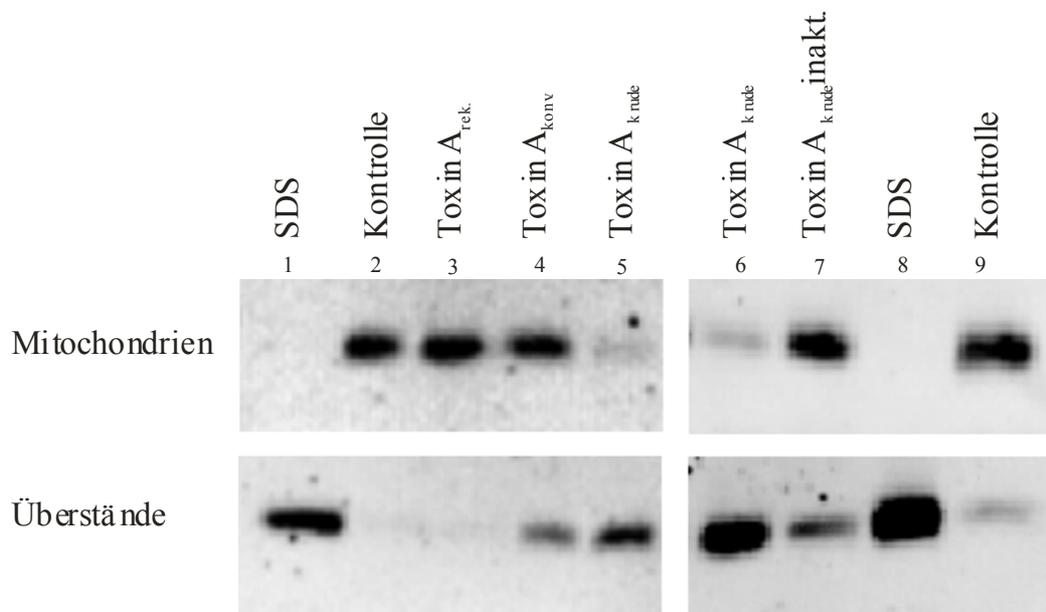


Abb. 28: Cytochrom C-Western Blot isolierter CHO-6-Mitochondrien und deren Überstände nach 1,5 h Inkubation bei 30 °C mit rekombinantem Toxin A (Spur 3), konventionell gereinigtem Toxin A (Spur 4) und krudem Toxin A, das nur durch eine Tyreoglobulinanreicherung aufgereinigt wurde (Spuren 5, 6 und 7: 5 min hitzeinaktiviert).

4.9 Aktivierung der p38 MAP-Kinase

Neben der apoptotischen Wirkung des Toxin A wird auch die Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinase p38 MAP-Kinase beschrieben (Warny et al., 2000). Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase erfolgt durch zellulären Stress wie osmotischen Schock oder durch genotoxische Substanzen. Ob die in der Literatur beschriebene Aktivierung der p38 MAP-Kinase durch das Toxin A auch durch Behandlung von Zellen mit dem rekombinanten Toxin geschieht, oder ob zusätzliche clostridialen Faktoren die Aktivierung bewirken, wurde untersucht. Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in CaCo-2-Zellen durch 500 ng/ml konventionell gereinigtes Toxin A bzw. rekombinantes Toxin A ist in der Abb. 29 dargestellt.

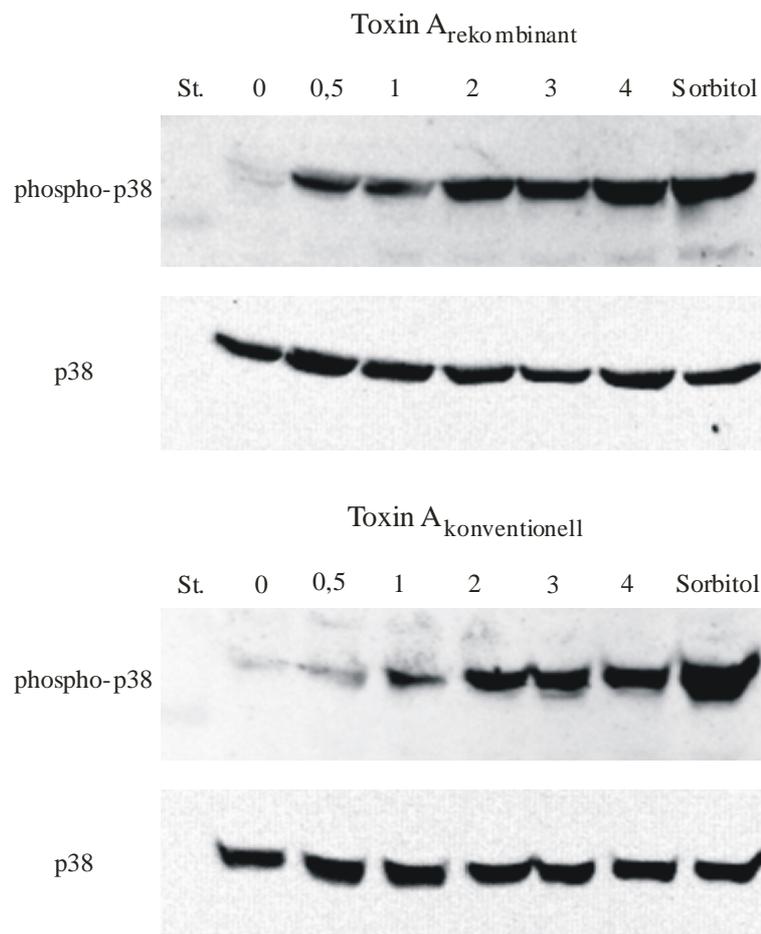


Abb. 29: Western Blot-Analyse des Verlaufes des Gehaltes an aktiver, phosphorylierter p38 bzw. des Gesamtgehaltes an p38 in CaCo-2-Zellen durch 4-stündige Vergiftung mit 500 ng/ml rekombinantem oder konventionell gereinigtem Toxin A.

Bereits nach 30 min Vergiftungszeit sind im Western Blot gegen die aktive, phosphorylierte Form der p38 durch beide Toxine deutliche Signale erkennbar. Das Signal bleibt bis 4 h konstant und gleicht in der Intensität dem Signal der Positivkontrolle, 500 mM Sorbitol aktiviert innerhalb von 30 min p38 in Zellen. Der Gesamtgehalt an p38 wurde durch Inkubation derselben Nitrocellulosemembranen mit Antikörpern gegen beide Formen, aktive und inaktive Form, nachgewiesen (Abb. 29). Die Menge an p38 blieb über 4 h konstant, eine gesteigerte Expression wird durch Vergiftung mit beiden Toxinen nicht induziert.

4.9.1 Aktivitätsbestimmung von RhoA und Rac1

Die Rho-GTPasen sind positiv in die Aktivierung der p38 MAP-Kinase eingeschaltet. Die Glucosylierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 durch Toxin A führt zu deren Inaktivierung. Um zu überprüfen, ob ein Ungleichgewicht der Rho-GTPasen die Aktivierung der p38 MAP-Kinase bewirkt, wurde eine semiquantitative Bestimmung von nicht modifiziertem, aktivem RhoA und Rac1 mit einer Affinitätspräzipitation, dem „pull down“ (Kap. 3.3.12), durchgeführt. Die Abb. 30 zeigt im Western Blot den zellulären Gehalt an aktivem RhoA bzw. Rac1 während des Vergiftungsverlaufs von CaCo-2-Zellen mit 500 ng/ml Toxin A über 5 Stunden. Deutlich ist, dass der Gehalt an aktivem RhoA innerhalb der beobachteten 5 Stunden bis auf ein Minimum unter 10 % abnimmt. Zur Überprüfung des Gesamtgehaltes von RhoA wurden die Lysate, die zur Präzipitation eingesetzt wurden, aufgetragen. In allen Lysaten (L0-L5) ist die gleiche Menge an RhoA zu erkennen.

Der Rac1-Western Blot der Lysate und dem „pull down“ mit GST-PAK zeigt die Kinetik der Inaktivierung von Rac1 in den identischen Proben, die für die RhoA-Präzipitation eingesetzt wurden. Nach Vergiftung mit Toxin A reduziert sich gleichfalls die Menge an präzipitiertem Rac1.

Die Abnahme der Signale des Rac1 in den Lysaten ist auf eine verminderte Erkennung des glucosylierten Rac1 zurückzuführen. Der verwendete monoklonale Antikörper (Klon, Transduction Laboratories) erkennt nicht glucosyliertes Rac1 (persönliche Mitteilung Dr. H. Genth). Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass die Abnahme der Signalintensität von Rac1 im Lysat nicht auf einer Abnahme des Proteingehaltes beruht, sondern ein Nachweis einer erfolgten Modifikation ist.

Die Abnahme an aktivem Rac1 im „pull down“ ist nach 1-3 Stunden nicht so deutlich wie die Abnahme an aktivem RhoA in dem gezeigten Versuch, der Gehalt ist jedoch nach 5 Stunden ebenfalls bis auf weniger als 10 % der Kontrollmenge abgesunken. Die verzögerte Abnahme von aktivem Rac1 gegenüber RhoA ist nicht uneingeschränkt repräsentativ, wie Abb. 31 nach Auswertung mehrerer Versuche zeigt.

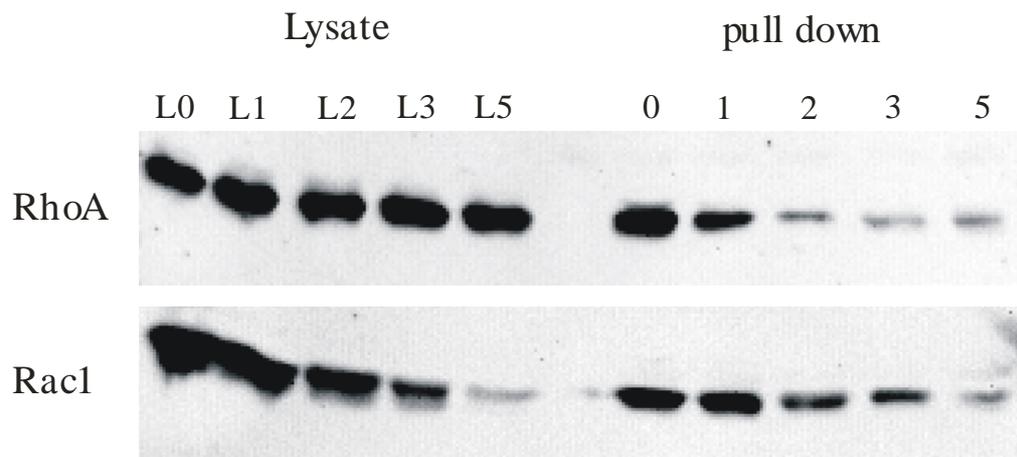


Abb. 30: Bestimmung von aktivem RhoA und Rac1 während des Vergiftungsverlaufes. Western Blot-Analyse des Gehaltes an RhoA und Rac1 in den Lysaten von CaCo-2-Zellen über einen Vergiftungszeitraum von 5 Stunden (Gesamtgehalt, linke Seite, L0-L5). Die offensichtliche Abnahme an Rac1 ist auf die mangelnde Erkennung des glucosylierten Rac1 durch den verwendeten Antikörper zurückzuführen. Rechts: Pull down-Präzipitations-Experiment des aktiven, nicht durch Toxin A glucosylierten RhoA bzw. Rac1, über 5 h Vergiftungszeit.

Die statistische Auswertung der Inaktivierung von RhoA und Rac1 über die Zeit ist in folgendem Diagramm gezeigt. Die Daten wurden aus Signalintensitäten vier unabhängiger pull down-Versuche generiert.

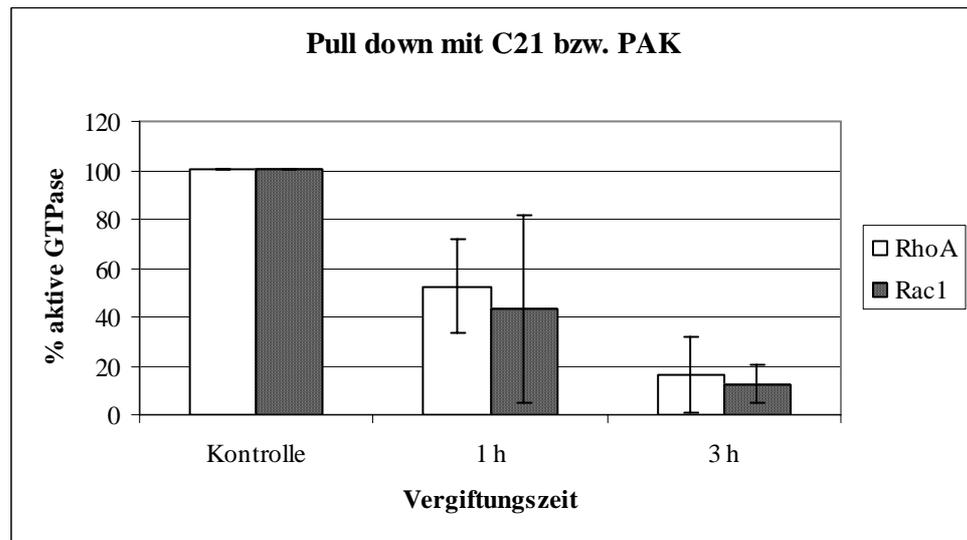


Abb. 31: Abnahme der Aktivität von RhoA bzw. Rac1 von CaCo-2-Zellen im Diagramm der Mittelwerte von 4 Vergiftungsversuchen mit Toxin A.

Innerhalb der ersten 30-60 min nach Vergiftungsbeginn ist bereits mehr als die Hälfte der aktiven RhoA und Rac1-Proteine inaktiviert. Die statistische Auswertung deutet an, dass durch die Behandlung mit Toxin A Rac1 schneller als RhoA inaktiviert wird. Dieses nur geringfügige Ungleichgewicht besteht jedoch nur in der Anfangsphase der Vergiftung (30 min, Daten nicht gezeigt) und ist in der pull-down-Bestimmung nach einer Stunde nahezu ausgeglichen.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Klonierung des Toxin A-Gens aus *C. difficile*, die Darstellung des rekombinanten Toxins und seine funktionelle Überprüfung.

Die Klonierung des 8133 bp großen Toxin A-Gens erfolgte aus der genomischen DNA des Stammes VPI 10463 und zwar mit einer Klonierungsstrategie, in der das Toxingen in drei Bereiche unterteilt wurde. Diese Bereiche bildeten die drei funktionellen Domänen: Rezeptorbindungs-, Translokations- und katalytische Domäne. Einzeln amplifiziert, in Vektoren ligiert und in *E. coli* vervielfältigt, konnten Mutationen, die während der Amplifikation der Teilstücke entstanden waren, durch mehrere gerichtete Polymerase-Kettenreaktionen korrigiert werden. Die Amplifikation des Toxingens in einem Schritt hätte die Rückmutationen entstandener Fehler nur durch erneute Sequenzierung des Gesamtgens erlaubt. Weiterhin ist es durch die Aufteilung in einzelne Teilbereiche möglich, zielgerichtete Mutationen einzuführen, die der Aufklärung der Struktur und Wirkung des Toxins, beispielsweise der Glucosyltransferaseaktivität, dienen können.

Für die Expression des Toxin A-Gens wurde das *Bacillus megaterium*-System gewählt, das eine stabile Expression großer heterologer Gene erlaubt (Rygu und Hillen, 1991). Das sonst übliche *E. coli*-Expressionssystem sollte umgangen werden, da dieses nicht frei von Endotoxinen ist. Zudem ist die Expression von clostridialen Genen in *E. coli* durch den hohen AT-Anteil, der im Toxin A-Gen 72,8 % ausmacht, erschwert. So benutzt *C. difficile* für *E. coli* ungewöhnliche Basentriplets, was zu deutlich schlechterer Expression von clostridialen Proteinen in *E. coli* führt.

Nach der Ligation zum 8133 bp großen Holotoxin-Gen wurde dieses in einen Vektor ligiert, der direkt von *E. coli* in *B. megaterium* transformiert werden sollte. Diese Ligation erwies sich als sehr ineffizient, was vermutlich in der Faltung des großen Toxin-Gens begründet ist, da auch die Rückligation in den Ursprungsvektor nicht gelang. Schwierigkeiten bei der Ligation und Expression wurden auch von Tang-Feldmann et al. (2002) und Kink und Williams (1998) beim Versuch der Klonierung der

Gene von Toxin A und B in *E. coli* beschrieben. Die Begründung für die ineffiziente Klonierung wird auch hier auf die Struktur der DNA zurückgeführt. Aus diesem Grund wurden bisher nur einzelne Toxin-domänen rekombinant hergestellt. Pfeiffer et al. beschrieben 2003 erstmals ein biologisch aktives rekombinant in *E. coli* exprimiertes Toxin B, dessen vollständige Charakterisierung nicht angegeben wurde.

B. megaterium exprimierte das Toxin A-Gen als 308 kDa großes Protein in einer optimierten Wachstumszeit von 3-4 h bei 37 °C, was den vom Hersteller angegebenen Expressionsbedingungen entsprach. Niedrigere Expressionstemperaturen oder längere Expressionszeiten führten zu keiner gesteigerten Ausbeute des Holotoxins. Die intrazelluläre Bildung des heterologen Proteins wurde mittels Gel-Elektrophorese des Lysates der induzierten Bacillus-Kulturen nachgewiesen.

Das rekombinante Toxin wurde durch die temperatursensitive Bindung an Thyreoglobulin angereichert, eine Affinitätsreinigung, die standardmäßig für das originäre Wildtyp-Toxin A eingesetzt wird. Die Anreicherung des rekombinanten Toxin A gelang auf 150 µg pro Liter *B. megaterium*-Kultur. Der Ertrag aus einem Liter *C. difficile*-Kultur ist zwar mit 1 mg Toxin A deutlich höher, eine Gewährleistung des Ausschlusses von assoziierten clostridialen Faktoren ist jedoch nicht gegeben.

Ertragreicher als die Aufreinigung des rekombinanten Toxins über die Thyreoglobulinbindung war die Aufreinigung des rekombinanten, C-terminal histidin-markierten Toxin A über eine Nickel-Affinitätsreinigung. Um die C-terminale Markierung zu erhalten, wurde das Toxin A-Gen nach Deletion des Stoppkodons in den Expressionsvektor pWHSBH ligiert, durch den die Expression des Toxin-Gens erst nach 6 zusätzlichen Histidinen beendet wird.

Die Aufreinigungsmethode des Toxins durch die Bindung an Nickelionen ist zudem in wesentlich kürzerer Zeit durchführbar. Während für die Anzucht und Reinigung des clostridialen Toxins 7 Tage benötigt werden, ist die Aufreinigung des TcdA_{His} aus einer Über-Nacht-Kultur in 6 h durchführbar (Abb. 32). Es wurden pro Liter *B. megaterium*-Kultur etwa 500 µg TcdA_{His} mit einer Konzentration von 250 µg/ml erhalten.

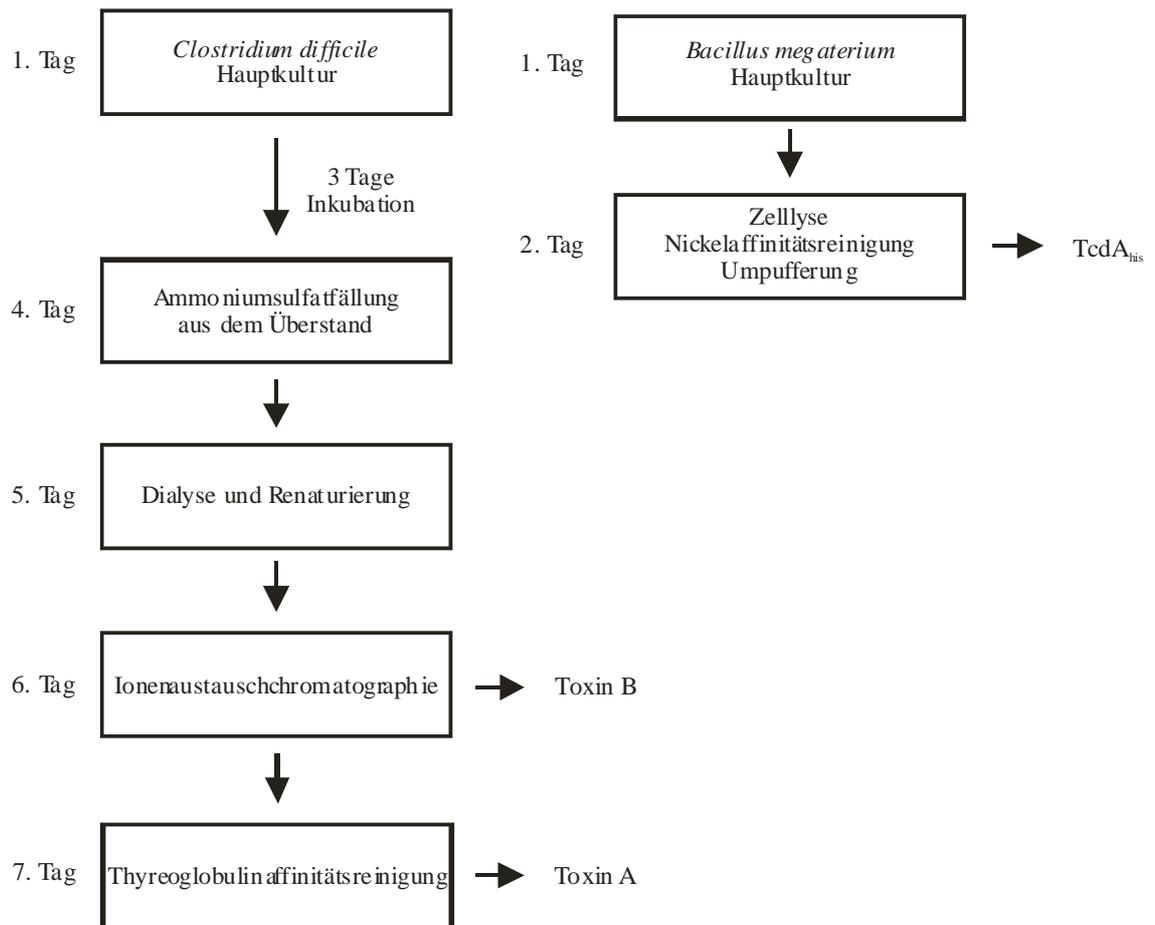


Abb. 32: Zeitvergleich der Aufreinigung von originärem Toxin A gegenüber rekombinantem TcdA_{His}. Die Arbeitszeit der Aufreinigung von Toxin A bzw. Toxin B aus *Clostridium difficile* belaufen sich auf 7 Tage ab der Beimpfung der Hauptkultur. Auf der rechten Abbildungshälfte ist die Zeit dargestellt, die für die Arbeitsschritte der Aufreinigung von rekombinantem Toxin A (histidinmarkiert) benötigt wird.

Zur funktionellen Charakterisierung des in *B. megaterium* exprimierten Toxin A wurden

1. immunchemische Untersuchungen unternommen,
2. die Enzymaktivität verglichen,
3. die Wirkung des Toxins auf Zellen im Zytotoxizitätstest untersucht und zusätzlich die Wirkung des Toxins auf Mitochondrien analysiert.

Immunchemische Charakterisierung des rekombinanten Toxins

Die korrekte Faltung der exponierten Bereiche wurde neben der Bindung an Thyreoglobulin im Blotverfahren getestet.

Das nicht denaturierte rekombinante Toxin wurde in der Dot blot-Analyse durch polyklonale Antikörper gegen das clostridiale Toxin A erkannt. Die Bindung der Antikörper an das rekombinante Protein zeigt die korrekte Faltung der exponierten Epitope. Auch unter denaturierten Bedingungen im Western Blot wurde das Protein durch die spezifischen Antikörper erkannt.

Zytotoxizitätsnachweis des rekombinanten Toxin A

Das gereinigte rekombinante Toxin wirkt zytotoxisch auf eukaryote Zellen in der Zellkultur. Das Toxin induziert morphologische Änderungen in unterschiedlichen Zelllinien (HUVEC, HT-29, CaCo-2, Swiss 3T3 und CHO-6-Zellen). Im Vergleich mit dem originären Toxin A zeigte das rekombinante Toxin mindestens eine vergleichbare Wirkstärke. Damit ist es fähig, an die Zielzellen zu binden, die eigene Endozytose zu induzieren und intrazellulär enzymatisch zu wirken. Die Vorinkubation des Toxins mit Antikörpern gegen das originäre clostridiale Toxin A verhinderte diesen zytotoxischen Effekt.

Die morphologischen Änderungen der Zellen und die Zytoskelett-Reorganisation belegen die Funktionalität der einzelnen Domänen des rekombinanten Toxins, der Rezeptorbindedomäne, der Translokationsdomäne und der katalytischen Domäne und damit die Vergleichbarkeit des rekombinanten Toxins mit dem originären clostridialen Toxin.

Die leicht zeitverzögerten Veränderungen der Zellen bei Vergiftung mit konventionell gereinigtem Toxin A sind vermutlich auf partielle Denaturierung des Toxins während

der längeren Aufreinigungsdauer zurückzuführen. Zur Aufreinigung des clostridialen Toxins sind neben der erheblich größeren Zeitspanne eine Denaturierung und eine Anhebung der Temperatur von 4 °C auf 37 °C während der Affinitätsreinigung an Thyreoglobulin nötig, was die Degradation und damit eine Abnahme der Aktivität fördert.

Glucosyltransferaseaktivität des rekombinanten Toxins

Die Glucosyltransferaseaktivität des histidingekoppelten Toxin A war im Vergleich zum konventionell gereinigten Toxin A *in vitro* um ein Vielfaches stärker. Es ist denkbar, dass diese gesteigerte Aktivität durch die Markierung des Toxins durch Histidin begründet ist, wodurch die Bindung des RhoA durch die katalytische Domäne durch eine veränderte Zugänglichkeit infolge veränderter Tertiärstruktur leichter möglich sein könnte. Die ungeminderte Bindung von Antikörpern im wenig sensitiven Nachweis des Western Blots schließt diese Vermutung nicht aus. Auch könnten clostridiale Faktoren wie Chaperone, die durch die Reinigungsschritte nicht vom originären Toxin abgetrennt werden können, die Glucosyltransferaseaktivität des Toxins hemmen, so dass nur die in die Zielzelle gelangte und prozessierte katalytische Domäne die maximale Aktivität besitzt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Aufreinigung des clostridialen Toxins, die die Denaturierung und anschließende Renaturierung beinhaltet, die Glucosyltransferaseaktivität verringert. Die spezifische Glucosyltransferaseaktivität der rekombinant in *E. coli* hergestellten katalytischen Domäne von Toxin B ist ebenfalls höher als die des Holotoxin B (Hofmann et al., 1997), was übertragbar auf das Toxin A ist und somit diese Annahme unterstützt.

Wirkung des Toxins auf Mitochondrien

He und Mitarbeiter beschrieben, dass die Toxine A und B schädigend auf Mitochondrien wirken und innerhalb von 15 min die Freisetzung reaktiver Sauerstoffintermediate (ROS) bewirken. Diese bewirken eine Freisetzung von Interleukinen und einen Übergang der Zellen in die Apoptose (He et al., 2002).

CHO-6-Zellen, die unter dem Einfluss von Toxin A stehen und morphologisch deutlich verändert sind, zeigen gegenüber unbehandelten Zellen eine reduzierte Vitalität,

gemessen anhand der Anfärbung der fragmentierten DNA durch DAPI. Die Anzahl der durch das DNA-Färbereagenz DAPI angefärbten apoptotischen Zellen ist jedoch erst nach 24 h Vergiftung mit Toxin A deutlich erhöht. Der Zelltod ist demnach eher ein Sekundäreffekt der Vergiftung, denn die zytotoxischen Auswirkungen auf das Zytoskelett sind bereits innerhalb von 4 h abgeschlossen.

Ob es eine schädigende Wirkung des Toxin A auf Mitochondrien gibt, wurde durch die Lokalisation des Cytochrom C untersucht. Im Cytoplasma von CHO-6- und CaCo-2-Zellen konnte selbst nach 24 h Vergiftung mit rekombinantem Toxin A kein aus den Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C nachgewiesen werden. Die Mitochondrien von primärkultivierten HUVEC-Zellen setzten erst nach einer Vergiftungszeit von 24 h partiell Cytochrom C frei.

Auch dieser Nachweis zeigt, dass die Schädigung der Mitochondrien, die zur Apoptose führt, nicht eine kurzfristige Reaktion auf die Vergiftung ist und damit konnte die dargestellte schnelle Mitochondrienschädigung durch Toxin A nicht mit dem rekombinanten Toxin A nachgewiesen werden (He et al., 2002). Damit ist diese biologische Wirkung wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der verwendeten Toxinpräparationen zurückzuführen. Wie das Ergebnis des Cytochrom C-Freisetzungsnachweises aus isolierten Mitochondrien zeigt, ist die Schädigung einem hitzelabilen Proteinfaktor zuzuschreiben, der in kruden Toxinpräparationen vorkommt. Durch die Thyreoglobulinreinigung kann der clostridiale Faktor nur unvollständig vom kruden Toxin abgetrennt werden, worauf die partielle Freisetzung des Cytochrom C aus den isolierten Mitochondrien bei Behandlung mit affinitätsgereinigtem clostridialem Toxin hindeutet.

Es könnte sich bei dem zusätzlichen Faktor um ein Chaperon handeln, das toxin-assoziiert vorliegt, sich bei Eintritt des Toxins während der Prozessierung löst und intrazellulär eine Mitochondrienschädigung bewirkt. Die hier gezeigte mitochondrienschädigende Wirkung des rekombinanten Toxin A stimmt mit der von Brito gezeigten überein und verstärkt die Vermutung einer Verunreinigung als Ursache der von der He et al. postulierten Glucosyltransferase-unabhängigen Wirkung.

Innerhalb des Pathogenitätslokus des *C. difficile* befinden sich zwei kleine weitere offene Leserahmen, wovon der eine das 19 kDa große TcdE kodiert (Tan et al., 2002) und mit den Genen für Toxin A und B koexprimiert wird (Mukherjee et al., 2002). Das

TcdE hat eine hohe Homologie zu phagenkodierten Holinen, die sich zu Poren in bakteriellen Membranen formieren. Die rekombinante Herstellung des TcdE in *E. coli* führt sofort zum Zellarrest und zur Lyse der Bakterien, noch bevor nennenswerte Mengen des Proteins gebildet werden (Tan et al., 2002). Somit könnte TcdE als sehr potenter direkter mitochondrienschädigender Faktor in Betracht gezogen werden.

Es ist deutlich, dass die Reinheit für die Untersuchungen weiterer Wirkungen des Toxin A unerlässlich ist. Mit der Expression des rekombinanten Toxin A ist es gelungen, dieses in stark verkürzter Zeit, potenter in der Glucosyltransferaseaktivität und frei von additionalen clostridialen Faktoren herzustellen. Dieses Toxin kann zur Untersuchung von proinflammatorischen Signalwegen eingesetzt werden, die durch Rho-GTPasen kontrolliert werden oder durch Toxin A aktiviert werden, wie z.B. die dem Toxin A zugeschriebene Aktivierung des p38 MAP-Kinase-Signalweges.

Aktivierung der p38-MAP-Kinase

Warny und Mitarbeiter beschrieben 2000, dass es in Folge der Behandlung mit Toxin A über die Aktivierung von MAP-Kinasen zu einer akuten Infiltration von Neutrophilen und einer Interleukin-8-Produktion kommt. Die Aktivierung der ERK, JNK und der p38 geschah innerhalb von 1-2 bzw. 12 Minuten (p38), was auf eine Aktivierung unabhängig von der Enzymaktivität des Toxins hindeutet. In diesem Zeitfenster ist die Endozytose des Toxins noch nicht abgeschlossen.

Das in *B. megaterium* exprimierte Toxin A, das somit frei von additionalen clostridialen Faktoren ist, wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob der p38-MAP-Kinase-Signalweg in Zielzellen durch die toxininhärente Wirkung aktiviert wird. MAP-Kinasen regulieren Zellantworten auf Stress und auf Wachstumsfaktoren und vermitteln Signale von der Zelloberfläche zum Nukleus über die ERK (extracellular signal-related kinase), die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) oder insbesondere die p38-MAP-Kinase.

Durch den Vergleich der Aktivierung des Signalweges der p38-MAP-Kinase durch die unterschiedlichen Toxine sollte untersucht werden, ob das TcdA_{His} sowie das originäre clostridiale Toxin A eine Aktivierung der p38 bewirken.

Die Aktivierung der p38 setzte nach Vergiftung mit den Toxinen innerhalb von 30 min ein und diese Aktivierung blieb konstant über mehrere Stunden.

Auch wenn eine gering zeitverzögerte Aktivierung der p38 durch das originäre Toxin A im Vergleich zum rekombinanten Toxin A deutlich wurde, ist doch gezeigt, dass die Aktivierung direkt durch das Toxin A bedingt ist.

Die Rho-GTPasen sind neben der Regulation des Zytoskeletts an der Aktivierung der p38-MAP-Kinase beteiligt. Die p38-MAP-Kinase wird durch die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 positiv reguliert, d.h. in Zelllinien, die konstitutiv aktive Rho-GTPasen bilden, wird die p38-MAP-Kinase aktiviert bzw. in dominant negativen Mutanten, bei denen die Effektor-domäne mutiert ist, wird die Il-1-induzierte Aktivierung inhibiert (Kyriakis und Avruch, 2001).

Dass inaktive Rho-GTPasen die p38 Aktivierung inhibieren, steht im Widerspruch zu der Wirkung des Toxins. Toxin A inaktiviert die Rho-GTPasen, folglich sollte es während einer Vergiftung mit Toxin A zu keiner Aktivierung der p38-MAP-Kinase kommen, da die glucosylierten Rho-GTPasen an keine anderen Effektoren binden können.

Eine Aktivierung der p38 durch die GTPasen könnte dadurch zustande kommen, dass die Rho-GTPasen eine unterschiedliche Inaktivierungskinetik besitzen, es somit zu einem transienten Ungleichgewicht von aktivem Rho und aktivem Rac in der Zelle kommt. Ein auch nur kurzzeitig andauerndes Ungleichgewicht könnte Auswirkungen auf den Aktivitätszustand der p38 bewirken, da der cross-talk zwischen den GTPasen gestört wird. Dieser cross-talk beschreibt eine gegenseitige Beeinflussung der Rho- und Rac-Signalwege. Rho vermag durch Sequestrierung von gemeinsam benutzten akzessorischen Proteinen eine Rac-vermittelte Signalübertragung zu stören. Eine schnelle Inaktivierung von RhoA würde die Hemmung auf Rac aufheben und somit Rac erlauben, die p38 MAP-Kinase zu aktivieren (Bishop et al., 2000).

Die pull-down-Experimente an CaCo-2-Zellen zeigten, dass in der langen Zeit, über die die Aktivierung der p38 anhält (bis zu 24 h, Mitteilung Dr. R. Gerhard), kein Ungleichgewicht, zumindest zwischen aktivem RhoA und Rac1 besteht, das eine solche Aktivierung der p38 begründen könnte. Bereits nach 4 h ist der zelluläre Gehalt an aktivem RhoA und Rac1 auf unter 10 % gesunken, womit die Rho-abhängige Aktivierung der p38 über 24 h unwahrscheinlich ist. Sollte die Aktivierung der p38 also durch unterschiedlich schnelle Inaktivierung von Rho oder Rac initiiert werden, lassen

die vorliegenden Ergebnisse nur den frühen Zeitraum der ersten 30 Minuten der Vergiftung für das entscheidende Signal zu. Zusätzliche Experimente sind somit notwendig, um eine konkrete Aussage zu treffen.

Die Zytoskelettzerstörung durch Cytochalasin D hat eine p38-Aktivierung zur Folge (Németh, 2004). Die lang anhaltende Aktivierung der p38 durch das Toxin A könnte demnach eine Folge der Zerstörung des Aktinzytoskeletts sein, obwohl die p38-Aktivatoren Rho, Rac und Cdc42 in Folge der Enzymaktivität des Toxins inaktiviert sind.

Ausblick

Mit dem in *B. megaterium* hergestellten rekombinanten Toxin A ist ein Werkzeug verfügbar, mit dem das inflammatorische Geschehen der durch *C. difficile* verursachten pseudomembranösen Colitis näher untersucht werden kann. Signalwege, die durch Toxin A beeinflusst werden, können durch das kontaminationsfreie Toxin besser charakterisiert werden, wobei zusätzliche Wirkungen von clostridialen Faktoren ausgeschlossen werden können. Dabei sind neben noch unbekanntem Aspekten der Rho-Signaltransduktion die Signalwege, die nicht durch die inhärente enzymatische Wirkung des Toxins vermittelt werden und somit Rho-unabhängig verlaufen, von entscheidender Bedeutung.

Weiter dient das Toxin A-Konstrukt als Vorlage für zielgerichtete Mutationen, z.B. im Bereich der Substratbindungsdomäne oder dem DXD-Motiv innerhalb der katalytischen Domäne, um nähere Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung machen zu können oder um ein enzymatisch inaktives Toxin zu generieren.

Durch die Herstellung des rekombinanten Toxin A sind essentielle Vorarbeiten für eine Kristallisation geleistet. Die Kristallstruktur des Toxins kann bei der Identifizierung des Rezeptors für Toxin A hilfreich sein. Die Identifikation der Rezeptorstruktur des *C. difficile* Toxin A ist für den therapeutischen Ansatz von großem Interesse.

6 ANHANG

A Sequenz des Toxin A-Gens mit hervorgehobenen Primererkennungssequenzen

sense 24 (5'-ACGTGGATCC-)
 1 5'- ATGCTTTAATATCTAAAGAAGAGTTAATAAACTCGCATATAGCATTAGACCAAGAGAA
 61 AATGAGTATAAACTATACTAACTAATTTAGACGAATATAATAAGTTAACTACAAACAAT
 121 AATGAAAATAAATATTTACAATTAATAAACTAAATGAATCAATTGATGTTTTATGAAT
sense /antisense CDA151-177
 181 AAATATAAACTTCAAGCAGAAATAGAGCACTCTCTAATCTAAAAAAGATATATTAATA
 241 GAAGTAATCTTATTAATAAAATCCAATACAAGCCCTGTAGAAAAAATTTACATTTTGTA
 301 TGGATAGGTGGAGAAGTCAGTGATATTGCTCTGAATACATAAAACAATGGGCTGATATT
sense 3
 361 AATGCAGAATATAATATAAACTGTGGTATGATAGTGAAGCATTCTTAGTAAATACACTA
 421 AAAAAGGCTATAGTTGAATCTTCTACCACTGAAGCATTACAGCTACTAGAGGAAGAGATT
 481 CAAAATCCTCAATTTGATAATATGAAATTTTACAAAAAAGGATGGAATTTATATATGAT
sense /antisense CDA542-574
 541 AGACAAAAAAGGTTTATAAATTATTATAAATCTCAAAATCAATAAACCTACAGTACCTACA
 601 ATAGATGATATTATAAAGTCTCATCTAGTATCTGAATATAATAGAGATGAAACTGTATTA
 661 GAATCATATAGAACAAATCTTTGAGAAAAATAAATAGTAATCATGGGATAGATATCAGG
sense SC
 721 GCTAATAGTTTGTACAGAACAAAGAGTTATAAATTTTATAGTCAGGAGTTGTTAAAT
 781 CGTGGAAATTTAGCTGCAGCATCTGACATAGTAAGATTATTAGCCCTAAA GAATTTTGGC
sense QS /antisense CDA285/287anti
 841 GGAGTATATTTAGATGTTGATATGCTCCAGGTATTCACTCTGATTTATTTAAAAACAATA
 901 TCTAGACCTAGCTCTATTGGACTAGACCGTTGGGAAATGATAAAATTAGAGGCTATTATG
 961 AAGTATAAAAAATATATAAATAATTATACATCAGAAAACCTTTGATAAACTTGATCAACAA
 1021 TTAAGATAAATTTTAACTCATTATAGAAAAGTAAAAGTAAAAATCTGAGATATTTTCT
 1081 AAATTAGAAAAATTTAAATGTATCTGATCTTGAATTTAAATAGCTTTTCGCTTTAGGCAGT
sense 4
 1141 GTTATAAATCAAGCCTTGATATCAAAACAAGGTTTCATATCTTACTAACCTAGTAATAGAA
 1201 CAAGTAAAAAATAGATATCAATTTTAAACCAACACCTTAACCCAGCCATAGAGTCTGAT
 1261 AATAACTTCACAGATACTACTAAAATTTTTCATGATTCATTATTTAATTCAGCTACCGCA
 1321 GAAAACCTATGTTTTTAAACAAAAATAGCACCATACTTACAAGTAGGTTTTATGCCAGAA
 1381 GCTCGCTCCACAATAAGTTTAAAGTGGTCCAGGAGCTTATGCGTCAGCTTACTATGATTC
 1441 ATAAATTTACAAGAAAATACTATAGAAAAAATTTAAAAGCATCAGATTTAATAGAATTT
sense 5
 1501 AAATCCAGAAAATAATCTATCTCAATTGACAGAACAAGAAAATAAATAGCTATGGAGC
 1561 TTTGATCAAGCAAGTGCAAAATATCAATTTGAGAAAATATGTAAGAGATTATACTGGTGGA
 1621 TCTCTTTCTGAAGACAATGGGGTAGACTTTAATAAAAAACTGCCCCTGACAAAAACTAT
 1681 TTATTAATAATAAAATTCATCAAAACAATGTAGAAGAAGCTGGAAGTAAAAATTATGTT
 1741 CATTATATCATAAGTTACAAGGAGATGATATAAGTTATGAAGCAACATGCAATTTATTT
 1801 TCTAAAAATCCTAAAAATAGTATTATTATACAACGAAATATGAATGAAAGTGCAAAAAAGC

Mutation
 Adenin zu Guanin
 AS 277 Lysin

1861 TACTTTTTAAGTGATGATGGAGAATCTATTTTGAATTAATAAATATAGGATACCTGAA ^{sense 6}
 1921 AGATTAATAAATAAGGAAAAAGTAAAGTAACCTTTATTGGACATGGTAAAGATGAATTC
 1981 AACACAAGCGAATTTGCTAGATTAAGTGTAGATTCACCTTCCAATGAGATAAGTTCATTT
 2041 TTAGATACCATAAAATTAGATATATCACCTAAAAATGTAGAAGTAACTTACTTGGATGT
 2101 AATATGTTTATGATTATTTAATGTTGAAGAACTTATCCTGGGAAGTTGCTATTAAGT
 2161 ATTATGGACAAAATTACTTCCACTTACCTGATGTAAATAAAAAATTCTATTACTATAGGA
 2221 GCAAATCAATATGAAGTAAGAATTAATAGTGAGGGAAGAAAAGAACTTCTGGCTCACTCA
 2281 GGTAATGGATAAATAAAGAAGAAGCTATTATGAGCGATTTATCTAGTAAAGAATACATT
 2341 TTTTTTGATTCTATAGATAATAAGCTAAAAGCAAAGTCCAAGAATATTCCAGGATTAGCA
 2401 TCAATATCAGAAGATATAAAAAACATTATTACTTGATGCAAGTGTAGTCTGATACAAAA
 2461 TTTATTTTAAATAATCTTAAGCTTAATATTGAATCTTCTATTGGGGATTACATTATTAT ^{HindIII}
 2521 GAAAAATTAGAGCCTGTAAAAATATAATTCACAATTCTATAGATGATTTAATAGATGAG ^{sense 7}
 2581 TTCAATCTACTTGAAAATGTATCTGATGAATTATATGAATTAATAAATAATCTA ^{antisense 1N (-CCTAGG 5')}
 2641 GATGAGAAGTATTTAATATCTTTTGAAGATATCTCAAAAAATAATTCAACTTACTCTGTA
 2701 AGATTTATTAACAAAAGTAATGGTGAGTCAGTTTATGTAGAAACAGAAAAAGAAATTTT ^{sense 20}
 2761 TCAAAATATAGCGAACATATTACAAAAGAAATAAGTACTATAAAGAATAGTATAATTACA
 2821 GATGTTAATGGTAATTTATTGGATAATATACAGTTAGATCATACTTCTCAAGTTAATACA ^{sense/antisense}
 2881 TTAAACGCAGCATTCTTTATTCAATCATTAAATAGATTATAGTAGCAATAAAAGATGACTG ^{CDA2 2925-2955}
 2941 AATGATTTAAGTACCTCAGTTAAGGTCAACTTTATGCTCAACTATTTAGTACAGGTTTA ^{sense 23}
 3001 AATACTATATGACTCTATCCAATTAGTAAATTTAATATCAAATGCAGTAAATGATACT
 3061 ATAAATGTACTACCTACAATAACAGAGGGGATACCTATTGTATCTACTATATTAGACGGA
 3121 ATAACTTAGGTGCAGCAATTAAGGAATTACTAGACGAACATGACCCATTACTAAAAAAA
 3181 GAATTAGAAGCTAAGGTGGGTGTTTTAGCAATAAATATGTCATTATCTATAGCTGCAACT ^{sense/antisense 9}
 3241 GTAGCTCAATTGTTGGAATAGGTGCTGAAGTACTATTTTCTTATTACCTATAGCTGGT
 3301 ATATCTGCAGGAATACCTTCATTAGTTAATAATGAATTAATATTGCATGATAAGGCAACT
 3361 TCAGTGGTAAACTATTTAATCATTGTCTGAATCTAAAAAATATGGCCCTCTAAAAACA
 3421 GAAGATGATAAAATTTTAGTTCCTATTGATGATTTAGTAATATCAGAAATAGATTTTAAAT
 3481 AATAATTCGATAAACTAGGAACATGTAATATATTAGCAATGGAGGGGGGATCAGGACAC
 3541 ACAGTACTGGTAATATAGATCACTTTTCTCATCTCCATCTATAAGTTCTCATATTCCT ^{sense 10}
 3601 TCATTATCAATTTATTCTGCAATAAGTATAGAAACAGAAAATCTAGATTTTCAAAAAAA
 3661 ATAATGATGTTACCTAATGCTCCTCAAGAGTGTGTTGGTGGGAACTGGAGCAGTTCCA
 3721 GGTAAAGATCATTGAAAAATGACGGAAGTACTTACTTATTCAATAAGAGATTATATAC
 3781 CCAGGTAATTTTACTGGAGATTCTATGCTTTTTTCGATTATGCAATAACTACATTAATA
 3841 CCAGTTTATGAAGACACTAATATTAATAAATAAATAACTAGATAAAGATACTAGAACTTCATA
 3901 ATGCCAACTATAACTACTAACGAAATTAGAAACAAATTATCTTATTCTTATTGATGGAGCA

3961 GGAGGAACCTACTCTTTATTATTATCTTCATATCCGATATCAACGAATATAAAATTTATCT Mutation Adenin zu Guanin AS 1332 Prolin

4021 AAAGATGATTTATGGATATTTAATATTGATAATGAAGTAAGAGAAATATCTATAGAAAAT sense 11

4081 GGTACTATTAATAAGGAAAGTTAATAAAGATGTTTAAAGTAAAATTGATATAAATAAA

4141 AATAAACTTATTATAGGCAATCAAACAATAGATTTTTCAGGCGATATAGATAAATAAGAT

4201 AGATATATATTCTTGACTTGTGAGTTAGATGATAAAATTAGTTTAAATAAGAAATAAAT

4261 CTTGTTGCAAAATCTTATAGTTTGTATTGTCTGGGGATAAAAATTATTTGATATCCAAT

4321 TTATCTAATACTATTGAGAAAATCAATACTTTAGGCCTAGATAGTAAAAATATAGCGTAC sense 1446C (5'CCATCC-)

4381 AATTACACTGATGAATCTAATAATAAATATTTTGGAGCTATATCTAAAACAAGTCAAAAA

4441 AGCATAATACATTATAAAAAAGACAGTAAAAATATATTAGAATTTTATAATGACAGTACA

4501 TTAGAATTTAACAGTAAAGATTTTATTGCTGAAGATATAAATGTATTTATGAAAGATGAT

4561 ATTAATACTATAACAGGAAAATACTATGTTGATAATAACTGATAAAAAGTATAGATTTTC

4621 TCTATTTCTTTAGTTAGTAAAAATCAAGTAAAAGTAAATGGATTATATTTAAATGAATCC sense 12

4681 GTATACTCATCTTACCTTGATTTTGTGAAAAATTCAGATGGACACCATAAATACTTCTAAT

4741 TTTATGAATTTATTTTGGACAATATAAGTTTCTGGAAATTGTTTGGGTTTGAAAAATATA

4801 AATTTGTAATCGATAAAATACTTTACCCTTGTGGTAAAATACTTGGATATGTAGAA

4861 TTTATTTGTGACAATAATAAAAAATATAGATATATATTTGGTGAATGGAAAAACATCGTCA sense/antisense CDA2 4915-4943

4921 TCTAAAAGCACTATATTTAGCGGAAAATGGTAGAAATGTTGTAGTAGAGCCTATATATAAT

4981 CCTGATACGGGTGAAGATATATCTACTTCACTAGATTTTTCCTATGAACCTCTCTATGGA sense 13

5041 ATAGATAGATATATAAATAAAGTATTGATAGCACCTGATTATATACAAGTTTAATAAAT

5101 ATTAATACCAATTATTATTCAAATGAGTACTACCCTGAGATTATAGTTCTTAACCCAAAT

5161 ACATTCCACAAAAAGTAAATATAAATTTAGATAGTCTTCTTTTGGAGTATAAATGGTCT

5221 ACAGAAGGAAGTGACTTTATTTAGTTAGATACTTAGAAGAAAGTAATAAAAAAATATTA

5281 CAAAAAATAAAGATCAAAGGTATCTTATCTAATACTCAATCATTTAATAAATGAGTATA

5341 GATTTTAAAGATATTAATAAACTATCATTAGGATATATAATGAGTAATTTAAATCATT

5401 AATTCTGAAAATGAATTAGATAGAGATCATTAGGATTTAAAATAATAGATAATAAAACT

5461 TATTACTATGATGAAGATAGTAAATTAGTTAAAGGATTAATCAATATAAATAATTCATTA sense 14

5521 TTCTATTTTGATCTTATAGAATTTAACTTAGTAACTGGATGGCAAATCAATGGTAAA SpeI

5581 AAATATTATTTTGATATAAATACTGGAGCAGCTTTAACTAGTTATAAATAATTAATGGT

5641 AAACACTTTTATTTAATAATGATGGTGTGATGCAGTTGGGAGTATTTAAAGGACCTGAT

5701 GGATTTGAATATTTTGCACCTGCCAATACTCAAATAATAACATAGAAGGTCAGGCTATA

5761 GTTTATCAAAGTAAATCTTAACCTTGAATGGCAAAAAATATTATTTTGATAATAACTCA

5821 AAAGCAGTCACTGGATGGAGAATTATTAACAATGAGAAATATTACTTTAATCCTAATAAT sense/antisense 15

5881 GCTATTGCTGCAGTCGGATTGCAAGTAATTGACAATAATAAGTATTATTCAATCCTGAC

5941 ACTGCTATCATCTCAAAGGTTGGCAGACTGTTAATGGTAGTAGATACTACTTTGATACT

6001 GATACCGCTATTGCCTTAATGGTTATAAACTATTGATGGTAAACACTTTTATTTGAT

6061 AGTGATTGTGATGAAAATAGGTGTGTTTGTAGTACCTCAATGGATTGAAATTTTGCA

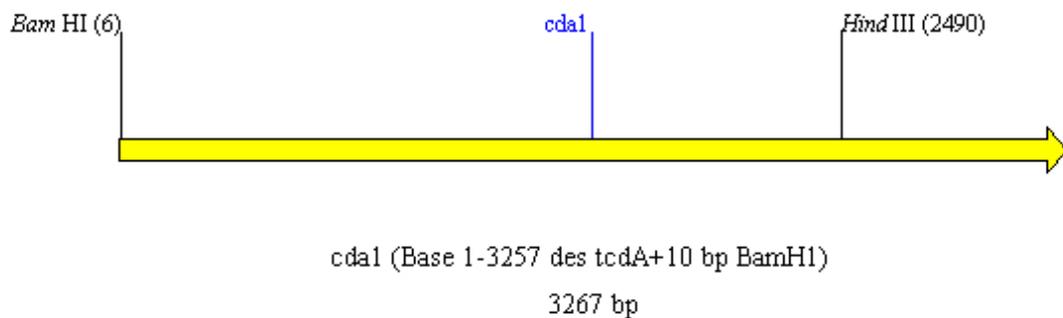
6121 CCTGCTAATACTTATAATAATAACATAGAAGGTCAGGCTATAGTTTATCAAAGTAAATTC
6181 TTAACCTTTGAATGGTAAAAAATATTACTTTGATAAATACTCAAAGCAGTTACCGGATGG
6241 CAAACTATTGATAGTAAAAAATATTACTTTAATACTAACACTGCTGAAGCAGCTACTGGA
6301 TGGCAAACCTATTGATGGTAAAAAATATTA^{sense 16}CTTTAATACTAACACTGCTGAAGCAGCTACT
6361 GGATGGCAAACCTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATACTAACACTGCTATAGCTTCA
6421 ACTGGTTATAACAATTATTAATGGTAAACATTTTTATTTAATACTGATGGTATTATGCAG
6481 ATAGGAGTGTTAAAGGACCTAATGGATTTGAATATTTTGCACCTGCTAATACGGATGCT
6541 AACAACATAGAAGGTCAAGCTATACTTTACCAAAATGAATTCTTAACCTTTGAATGGTAAA
6601 AAATATTACTTTGGTAGTGACTCAAAGCAGTTACTGGATGGAGAATTATTAACAATAAG
6661 AAATATTACTTTAATCCTAATAATGCTATTGCTGCAATTCATCTATGCACTATAAAATAAT
6721 GACAA^{sense/antisense 17}GTATTACTTTAGTTATGATGGAATTCTTCAAATGGATATATTACTATTGAAAGA
6781 AATAATTTCTATTTTGGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAACAGGAGTATTTAAAGGA
6841 CCTAATGGATTTGAGTATTTTGCACCTGCTAATACTCACAATAATAACATAGAAGGTCAG
6901 GCTATAGTTTACCAGAACAAATTCTTAACCTTTGAATGGCAAAAAATATTATTTGATAAT
6961 GACTCAAAGCAGTTACTGGATGGCAAACCATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATCTT
7021 AACACTGCTGAAGCAGCTACTGGATGGCAAACCTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAAT
7081 CTTAACACTGCT^{sense 18}GAAGCAGCTACTGGATGGCAAACCTATTGATGGTAAAAAATATTACTTT
7141 AATACTAACACTTTTCATAGCCTCAACTGGTTATAACAAGTATTAATGGTAAACATTTTTAT
7201 TTTAATACTGATGGTATTATGCAGATAGGAGTGTTAAAGGACCTAATGGATTTGAATAC
7261 TTTGCACCTGCTAATACGGATGCTAACAACATAGAAGGTCAAGCTATACTTTACCAAAAT
7321 AAATTTCTTAACCTTTGAATGGTAAAAAATATTACTTTGGTAGTGACTCAAAGCAGTTACC
7381 ^{sense 19}GGACTGCGAACTATTGATGGTAAAAAATATTACTTTAATACTAACACTGCTGTTGCAGTT
7441 ACTGGATGGCAAACCTATTAATGGTAAAAAATACTACTTTAATACTAACACTTCTATAGCT
7501 TCAACTGGTTATACAATTATTAGTGGTAAACATTTTTATTTAATACTGATGGTATTATG
7561 CAGATAGGAGTGTTAAAGGACCTGATGGATTTGAATACTTTGCACCTGCTAATACAGAT
7621 GCTAACAATATAGAAGGTCAAGCTATAACGTTATCAAATAGATTCCCTATATTTACATGAC
7681 AATATATATTATTTGGTAATAATTCAAAGCGGCTACTGGTTGGGTAACCTATTGATGGT
7741 AATAGATATTACTTCGAGCCTAATACAGCTATGGGTGCGAATGGTTATAAAACTATTGAT
7801 AATAAAAAATTTTTACTTTAGAAATGGTTACCTCAGATAGGAGTGTTTAAAGGGTCTAAT
7861 GGATTTGAATACTTTGCACCTGCTAATACGGATGCTAACAATATAGAAGGTCAAGCTATA
7921 CGTTATCAAATAGATTCTTACATTTACTTGGAAAAATATATTACTTTGGTAATAATTCA
7981 AAAGCAGTTACTGGATGGCAAACCTATTAATGGTAAAGTATATTACTTTATGCCTGATACT
8041 GCTATGGCTGCAGCTGGTGGACTTTTCGAGATTGATGGTGTATATATTTCTTTGGTGT
8101 GATGGAGTAAAAGCCCCTGGGATATATGGCTAA -3'
^{antisense 25 (-CCTAGGTGCA-5')}

B Sequenzen der Primer, die zur Rückmutation von den während der Amplifikation entstandenen Fehlern der Toxin A-Sequenz benötigt wurden, bzw. Primer-Oligonukleotide zur Generierung der Histidinmarkierung⁺ oder zur Sequenzierung der Vektoren^a.

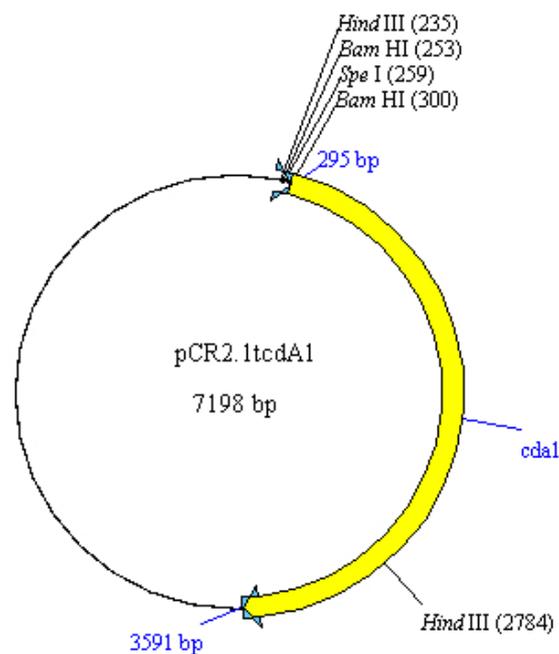
interne Bezeichnung	Kurzbeschreibung der Position	Sequenz 5' → 3'
151*	CDA1 151-177	5'-CTA AAT GAA TCA ATT GAT GTT TTT ATG-3'
151A*	CDA1 151-177anti	5'-CAT AAA AAC ATC AAT TGA TTC ATT TAG-3'
542*	CDA1542-574 30.7.01	5'- GAC AAA AAA GGT TTA TAA ATT ATT ATA AAT CTC -3'
542A*	CDA1542-574 30.7.01	5'-GAG ATT TAT AAT AAT TTA TAA ACC TTT TTT GTC -3'
538*	CDA1538-574sense	5'-GAT AGA CAA AAA AGG TTT ATA AAT TAT TAT AAA TCT C-3'
538A*	CDA1538-574anti	5'-GAG ATT TAT AAT AAT TTA TAA ACC TTT TTT GTC TAT C-3'
QS	CDAD285/287A sense	5'-GCG GAG TAT ATT TAG CTG TTG CTA TGC TTC CAG G-3'
258A	CDA 285/287Aanti	5'-CCT GGA AGC ATA GCA ACA GCT AAA TAT ACT CCG C-3'
2925*	CDA2 2925-2955	5'-GAT GTA CTG AAT GAT TTA AGT ACC-3'
2925A*	CDA2 2925-2955anti	5'-GGT ACT TAA ATC ATT CAG TAC ATC-3'
4915*	CDA2 4915-4943	5'-CGT CAT CTA AAA GCA CTA TAT TTA GCG G-3'
4915A*	CDA2 4915-4943anti	5'-CCG CTA AAT ATA GTG CTT TTAGAT GAC G-3'
pWHS ^a	pWH1520MCSsense	5'-CTA ACT CAA TTA AGA TAG TTG ATG G -3'
pWHA ^a	pWH1520MCSanti	5'-GCT CGC GAA AGC TTG CAT GCC TGC -3'
SBH ⁺	Spe-Bam-His	5'-CTA GTG GAT CCC ATC ATC ATC ATC ATT AGA -3'
SBHA ⁺	Spe-Bam-His-anti	5'-GAT CTC TAA TGA TGA TGA TGA TGA TGG GAT CCA -3'
SHB ⁺	Spe-His-Bam	5'-CTA GTC ATC ATC ATC ATC ATC ATG -3'
SHBA ⁺	Spe-His-Bam-anti	5'-GAT CCA TGA TGA TGA TGA TGA TGA -3'
stopS ⁺	TopoCDAstopsense	5'-CGC CCT TCG TGG ATC CGC CAT ATA TCC CAG GGG -3'
stopA ⁺	TopoCDAstopanti	5'-CCC CTG GGA TAT ATG GCG GAT CCA CGA AGG GCG-3'

C Die folgenden Abbildungen der Vektoren (1a-6) zeigen zur Ergänzung der Abbildung 10 (Ligationsschema, Seite 44) (a) die Fragmente aus dem Toxin A-Gen, die amplifiziert und (b) in den Vektor pCR2.1TOPO durch das TA-Cloning ligiert wurden. Die Angaben der Restriktionsenzyme *Bam*H I, *Spe* I und *Hind* III zeigen deren Basenpositionen innerhalb des Fragments bzw. des Vektors.

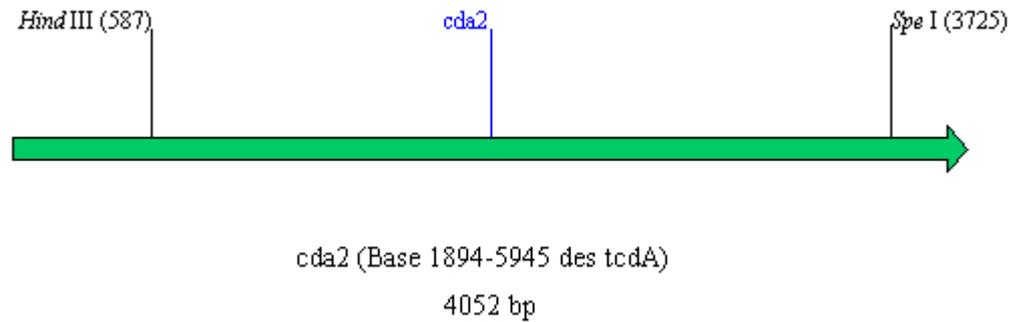
1a) Amplifizierter Bereich des Toxin A-Gens („*cda1*“, Base 1-3257 des Gens). Am 5'-Ende wurde durch die Amplifikation ein 10 bp langer Bereich angefügt, der eine *Bam*H I-Schnittstelle beinhaltet.



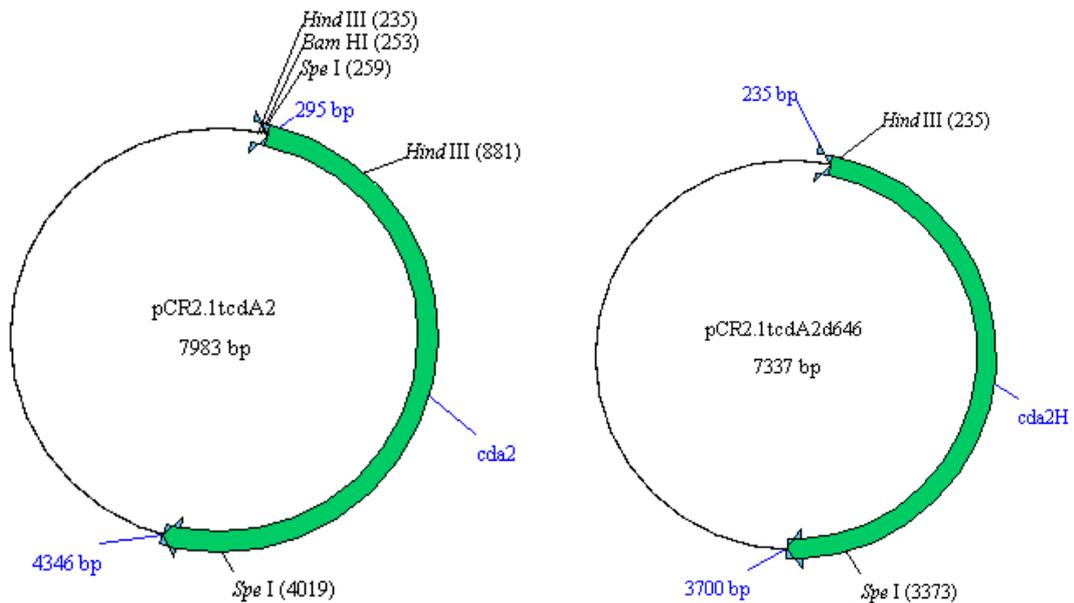
1b) pCR2.1*tcdA1*. Das amplifizierte „*cda1*“ wurde in den Vektor pCR2.1TOPO ligiert.



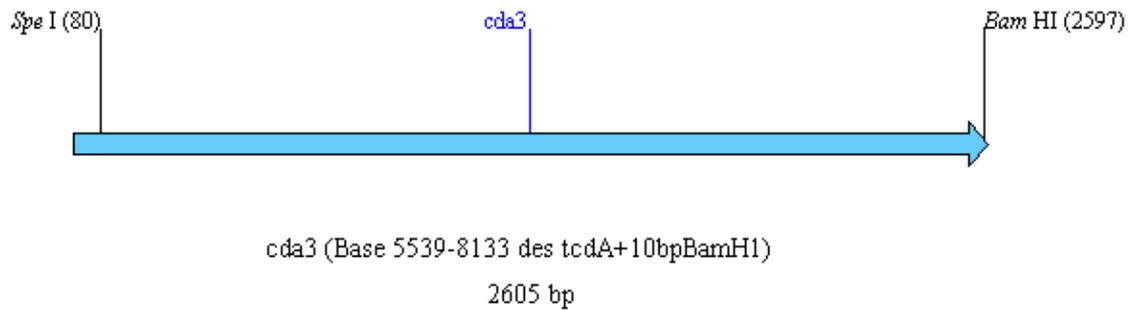
- 2a) Amplifizierter mittlerer Bereich des Toxin A-Gens („cda2“, Base 1894-5945 des Gens).



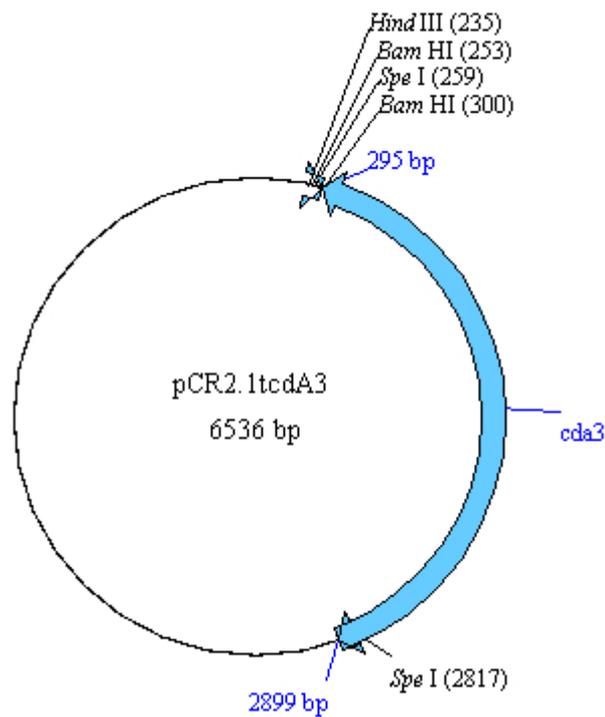
- 2b) Links: pCR2.1tcdA2. TA-Cloning des Vektors pCR2.1TOPO mit dem amplifizierten „cda2“. Rechts: pCR2.1tcdA2Δ646. Religierter pCR2.1tcdA2-Vektor nach *Hind* III-Restriktion.



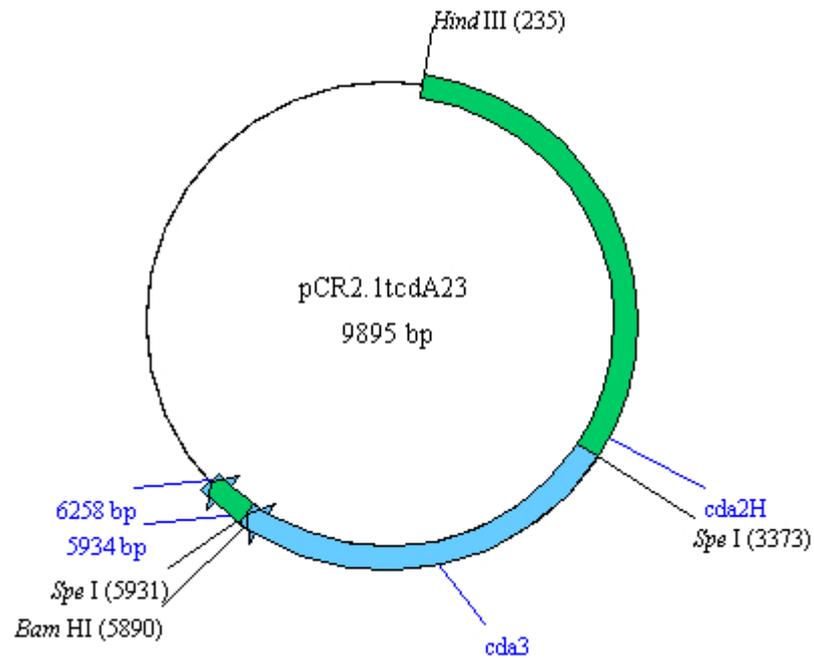
- 3a) Amplifizierter Bereich des Toxin A-Gens („*cda3*“, Base 5539-8133). Am 3'-Ende wurde durch die Amplifikation ein 10 bp langer Bereich angefügt, der eine *Bam*H I-Schnittstelle beinhaltet.



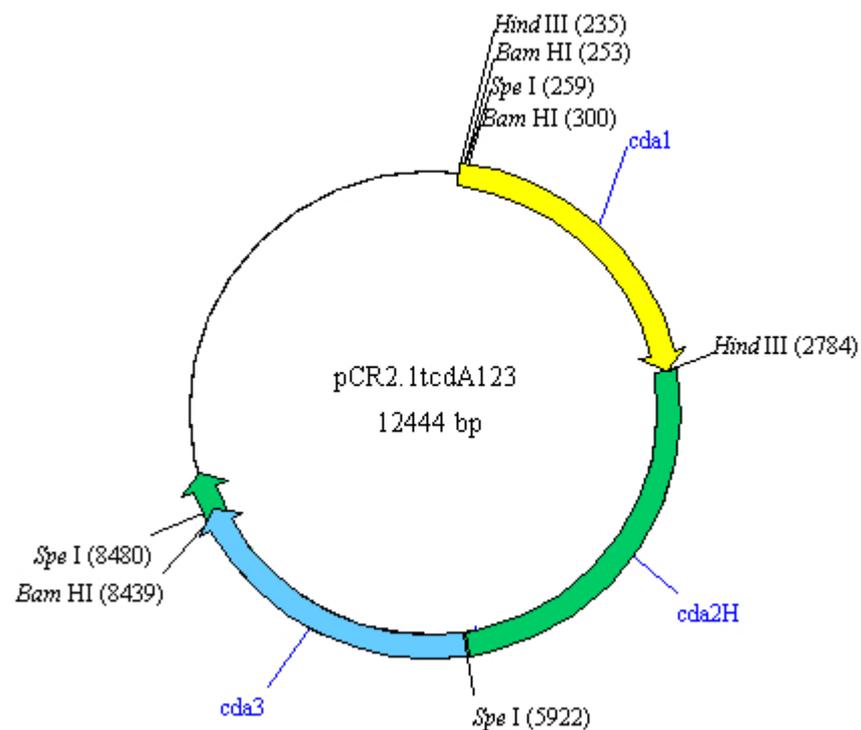
- 3b) pCR2.1*tcdA3*. Der amplifizierte Bereich konnte nur in umgekehrter Orientierung in den Vektor pCR2.1TOPO ligiert werden.



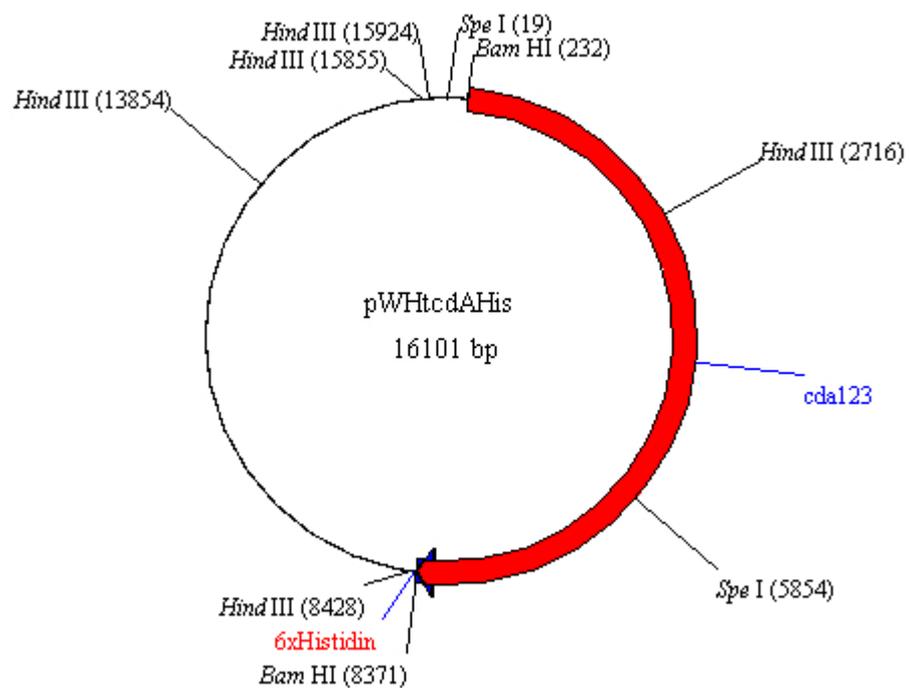
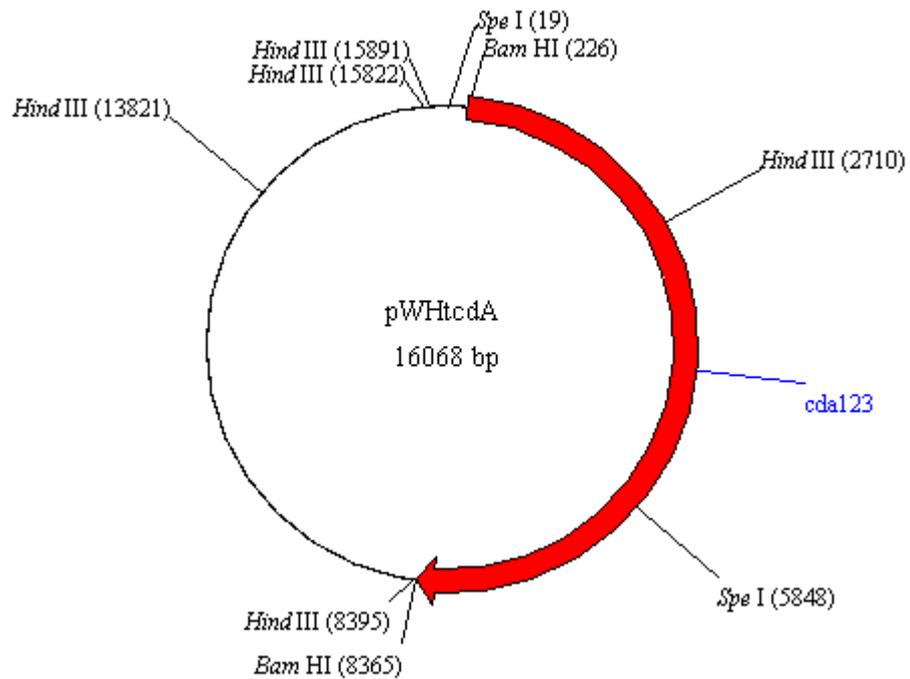
- 4) pCR2.1*tcdA23*. Ligation des durch Restriktion mit *Spe* I erhaltenen Fragments aus pCR2.1*tcdA3* in den Vektor pCR2.1*tcdA2*Δ646.



- 5) pCR2.1*tcdA123*. Ligation des Fragments, das durch *Hind* III-Restriktion aus pCR2.1*tcdA1* isoliert wurde, in den Vektor pCR2.1*tcdA23*.



- 6) pWHtcdA. Das durch *Bam*HI Schnittstellen flankierte Toxin A-Gen (rot) wurde aus dem pCR-Vektor isoliert und in den mit *Bam*HI linearisierten pWH1520 (oben) bzw. in den Vektor pWHSBH (unten) ligiert.



7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin, Kohlenstoff
Da	Dalton
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	„et alii“ (und andere)
FCS	Fötale Kälberserum
FPLC	fast protein liquid chromatography
G	Guanin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
M	molar
N-	Amino-
ORF	open reading frame, Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N,'-Tetramethylenylendiamin
<i>tcdA</i>	Gen des Toxin A (<i>C. difficile</i>)
TcdA, TcdA _{His}	hier Toxin A rekombinant, histidinmarkiert
TcdB	Toxin B
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	„transfer“-Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Bishop, A.L., and Hall, A.** (2000): Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348**, 241-255
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
- Branka, J.E., Vallette, C.F., Jarry, A., Boullanna, C., Lamarre, P., Van P.N., and Laboisse, C.L.** (1997): Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes. *Gastroenterology* **112**, 1887-1894
- Brito, G.A., Fujji, J., Carneiro-Filho, B.A., Lima, A.A., Obrig, T., and Guerrant, R.L.** (2002): Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 Cells. *JID* **186**, 1438-1447
- Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, J., Jeckel, D., and Aktories, K.** (1998): A common motif of eukaryotic glucosyltransferases is essential for the enzym activity of large clostridial dytotoxins. *J Biol Chem* **273**, 19566-19572
- Cryns, V., and Yuan, J.** (1998): The cutting edge: caspases in apoptotis and disease. In: Lockshin R., Zakeri Z., Tilly J. eds. *When cells die*. New York: Wiley-Liss, 177-210
- Dupui, B., and Sonenshein, A.L.** (1998): Regulated transcription of *Clostridium difficile* genes. *Mol Microbiol* **27**(1), 107-120
- Faust, C., Ye, B., and Song, K.P.** (1998): The enzymatic domain of *Clostridium difficile* toxin A is located within its N-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 100-105
- Frisch, C., Gerhard, R., Aktories, K., Hofmann, F., and Just, I.** (2003): The complete receptor binding domain of *Clostridium difficile* toxin A is required for endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 706-711
- Genth, H., Aktories, K., and Just, I.** (1999): Monoglucosylation of RhoA at Threonine-37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem* **274**, 29050-29056
- Gerhard, R., Schmidt, G., Hofmann, F., and Aktories, K.** (1998): Activation of Rho GTPases by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in CaCo-2 cells. *Infect Immun* **66**, 5125-5131

- Hall, I.C., and O'Toole, E.** (1935): Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* **49**, 309-402
- Hammond, G.A., Lyerly, D.M., and Johnson, J.L.** (1997): Transcriptional analysis of the toxigenic element of *Clostridium difficile*. *Microb Pathog* **22**, 143-154
- Haslam, S.C., Ketley, J.M., Mitchell, T.J., Stephan, J., Burdon, D.W., and Candy, D.C.A.** (1986): Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. *J Med Microbiol* **21**, 293-297
- He, D., Hagen, S.J., Pothoulakis, C., Chen, M., Medina, N.D., Warny, M., and LaMont, J.T.** (2000): *Clostridium difficile* toxin A causes early damage to mitochondria in cultured cells. *Gastroenterology* **119**, 139-150
- He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A.C., Pothoulakis, C., and LaMont, J.T.** (2002): *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte Il-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* **122**, 1048-1057
- Hecht, G., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., Madara J.L.** (1988): *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* **82**, 1516-1524
- Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., and Aktories, K.** (1997): Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem* **272**, 11074-11078
- Hofmann, F., Busch, C., and Aktories, K.** (1998): Chimeric clostridial cytotoxins: identification of the N-terminal region involved in protein substrate recognition. *Infect Immun* **66**, 1076-1081
- Jiang, X., and Wang, X.** (2004): Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**, 87-106
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K.** (1995): Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**, 500-503
- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., Green, G.A., and Aktories, K.** (1996): Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J Biol Chem* **271**, 10149-10153

- Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., and Aktories, K.** (1997): *Clostridium difficile* toxin B as a probe for Rho GTPases. "Bacterial toxins – Tools in cell biology and pharmacology" (K. Aktories, Ed.), 159-168. Chapman & Hall, Weinheim, Germany
- Just, I.** (1998): *Clostridium difficile*. Recent advances in the pathogenesis of gastrointestinal bacterial infections (P. Rampal, T. Boquet), John Libbey Eurotext, Paris, 135-142
- Just, I., and Gerhard, R.** (2004): Large clostridial cytotoxins. Rev Physiol Biochem Pharmacology. Epub ahead of print. Springer Verlag
- Kelly, C.P., Pothoulakis, C., and LaMont, J.T.** (1994): *Clostridium difficile* colitis. New England J Med **330**, 257-262
- Kelly, C.P., and LaMont J.T.** (1998): *Clostridium difficile* infection. Annu Rev Med **49**, 375-390
- Kink, J.A., and Williams, J.A.** (1998): Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. Infect Immun **66**, 2018-2025
- Krivan, H.C., and Wilkins, T.D.** (1987): Purification of *Clostridium difficile* toxin A by affinity chromatography on immobilized thyroglobulin. Infect Immun **55**, 1873-1877
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J.** (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Phys Reviews **81**, 807-869
- Letourneur, O., Ottone, S., Delauzun, V., Bastide, M.C., and Foussadier, A.** (2003): Molecular cloning, overexpression in *E. coli*, and purification of 6x his-tagged C-terminal domain of *Clostridium difficile* toxin A and B. Protein Expr Purif **31** (2), 276-286
- Liu, T.S., Musch, M.W., Sugi, K., Walsh-Reitz, M.M., Ropeleski, M.J., Hendrickson, B.A., Pothoulakis C., LaMont, J.T., and Chang, E.B.** (2003): Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol **284**, C1073-C1082
- Lyerly, D.M., Lockwood, D.E., Richardson, S.H., Wilkins, T.D.** (1982): Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. Infect Immun **35**, 1147-1150
- Meinhardt, F.** (1989): Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. Appl Microbiol Biotechnol **30**, 343-350

- Mukherjee, K., Karlsson, S., Burman, L.G., and Akerlund, T.** (2002): Proteins released during high toxin production in *Clostridium difficile*. *Microbiol-Sgm* **148**, 2245-2253
- Németh, Z.H., Deitch, E.A., Davidson, M.T., Szabó, C., Vizi, E.S., and Haskó, G.** (2004): Disruption of the actin cytoskeleton results in nuclear factor- κ B activation and inflammatory mediator production in cultured human intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* **200**, 71-81
- Perfrettini, J.L., Gissot, M., Souque, P., and Ojcius, D.M.** (2002): Modulation of apoptosis during infection with Chlamydia. *Methods in Enzymology* **358**, 334-344
- Pfeiffer, G., Schirmer, J., Leemhuis, J., Busch, C., Meyer, D.K., Aktories, K., and Barth, H.** (2003): Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eucaryotic cells. *J Biol Chem* **278** (45), 44535-44541
- Popoff, M.R., Chaves, O.E., Lemichez, E., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., Chardin, P., Cussac, D., Chavrier, P., Flatau, G., Giry, M., Gunzburg, J., and Boquet, P.** (1996): Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for *Clostridium sordellii* lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem* **271**, 10217-10224
- Pothoulakis, C., Gilbert, R.J., Cladaras, C., Castagluolo, I., Semenza, G., Hitti, Y., Montcrief, J.S., Linevsky, J., Kelly, C.P., Nikulasson, S., Desai, H.P., Wilkins, T.D., and LaMont, J.T.** (1996): Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *J Clin Invest* **98**, 641-649
- Rygus, T., and Hillen, W.** (1991): Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilitation. *Arch Microbiol* **155**, 535-542
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA
- Sauerborn, M., and von Eichel-Streiber, C.** (1990): Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A. *Nucl Acids Res* **18**, 1629-1630

- Sauerborn, M., Leukel, P., and von Eichel-Streiber, C.** (1997): The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cells and prevents mouse lethality. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 45-54
- Schulze, J., and von Eichel-Streiber, C.** (1990): Cloning and characterization of the *Clostridium difficile* toxin B gene. *Zentral Bakteriell Mikrobiol. Hyg. [A]* **273**: 126
- Soehn, F., Wagenknecht-Wiesner, A., Leukel, P., Kohl, M., Weidmann, M., von Eichel-Streiber, C., and Braun, V.** (1998): Genetic rearrangements in the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* strain 8864: implications for transcription, expression and enzymatic activity of toxins A and B. *Molecular & General Genetics* **285**, 222-232
- Spyres, L.M., Qa'Dan, M., Maeder, A., Tomasek, J.J., Howard, E.W., and Ballard, J.D.** (2001): Cytosolic delivery and characterization of the TcdB glucosylating domain by using heterologous protein fusion. *Infect Immun* **69**, 599-601
- Tan, K.S., Wee, B.Y., and Song, K.P.** (2002): Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol*, **50** (7), 613-619
- Tang-Feldmann, Y.J., Ackermann, G., Henderson, J.P., Silva, J., and Cohen, S.H.** (2002): One-step cloning and expression of *Clostridium difficile* toxin B gene (*tcdB*). *Mol Cell Probes* **16**, 179-183
- Ward, S.J., Douce, G., Dougan, G., and Wren, B.W.** (1999): Local and systemic neutralizing antibody responses induced by intranasal immunization with the nontoxic binding domain of toxin A from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* **67**, 5124-5132
- Warny, M., Keates, A.C., Keates, S., Castagliuolo, I., Zacks, J.K., Aboudola, S., Qamar, A., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., and Kelly, C.P.** (2000): p38 MAP kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production and enteritis. *J Clin Invest* **105**, 1147-1156

VERÖFFENTLICHUNG

S. Burger, F. Hofmann, H. Genth, I. Just, and R. Gerhard (2003): Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. Biochemical and Biophysical Research Communications 307, 584–588

R. Gerhard, S. Burger, H. Tatge, H. Genth, I. Just, and F. Hofmann (2005): Comparison of wild type with recombinant *Clostridium difficile* toxin A . Microbial Pathogenesis, in Druck.

ZUR VERÖFFENTLICHUNG EINGEREICHT

R. Gerhard, S. Burger, H. Tatge, H. Genth, J. Borlak, and I. Just: *Clostridium difficile* Toxin A induces expression of RhoB via p38 MAP kinase

POSTER

S. Burger, F. Hofmann, H. Genth, I. Just, and R. Gerhard (2003): Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A in a *Bacillus megaterium* expression system. Poster. DGPT Frühjahrstagung, Mainz

S. Burger, I. Just, and R. Gerhard (2004): *Clostridium difficile* toxin A induces mitochondrial cytochrome C release in long term intoxication of cells but has no direct effect on mitochondria. Poster. DGPT Frühjahrstagung, Mainz