

**Hemmung der durch *Clostridium sordellii*
Letales Toxin induzierten Apoptose mit
Tauroursodeoxycholsäure**

-

**Kritische Rolle des
Phosphoinositid-3-Kinase /Akt-
Signalweges**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biochem. Florian Schulz

geboren am 03.09.1979 in Salzgitter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis September 2009 an dem Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Professor Dr. H. Genth angefertigt.

Referent: Professor Dr. rer. nat. H. Genth

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. M. Gaestel

Tag der Promotion: 23.11.2009

Erklärung zur Dissertation

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation “Hemmung der durch *Clostridium sordellii* Letales Toxin induzierten Apoptose mit Tauroursodeoxycholsäure - Kritische Rolle des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweges” selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 23.11.2009

Florian Schulz

Danksagung

Danksagung

Zunächst möchte ich allen danken, die mich während der Zeit dieser Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Für die interessante Aufgabenstellung gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Harald Genth. Er hat mich während dieser Doktorarbeit hervorragend betreut und mit fachlichem Rat unterstützt. Weiterhin danke ich ihm für die Übernahme des Referates.

Dem Institutsleiter Prof. Dr. Ingo Just danke ich für die Eröffnung der Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Matthias Gaestel möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates dieser Dissertation bedanken.

Danken möchte ich auch allen dauerhaften und wechselnden Mitgliedern der AG Genth. Es hat Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Ein besonderer Dank gilt Ilona Klose für ihre Hilfsbereitschaft und die Anregung, hin und wieder doch ein wenig Ordnung am Arbeitsplatz einfließen zu lassen. Gedankt sei auch meinen „(Ex)-Leidensgenossen“ Stefanie Huelsenbeck und Martin May. Für die Mitarbeit an diesem Projekt danke ich den Strukturanden Marta Lica und Vanessa Brandes sowie der Diplomandin Maria Reichenbach.

Ein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Toxikologie, deren namentliche Erwähnung den Rahmen dieser Danksagung sprengen würde. Sie garantierten immer eine angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Bei Tonio Oumeraci bedanke ich mich für die ständige Versorgung mit überlebenswichtigen Päckchen und für die Restaurantbesuche freitags mittags, die ein wenig Abwechslung zur mageren Mensakost boten.

Zum Abschluss möchte ich mich besonders bei meiner Familie für ihre Unterstützung während der Doktorarbeit bedanken.

Publikationen

Publikationen

Teile dieser Arbeit und themenverwandte Arbeiten wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht:

Publikationen

Dreger SC, **Schulz F**, Huelsenbeck J, Gerhard R, Hofmann F, Just I, Genth H: Killing of Rat Basophilic Leukemia Cells by Lethal Toxin from *Clostridium sordellii*: Critical Role of Phosphatidylinositide 3'-OH Kinase/Akt Signaling. *Biochemistry*, 2009, 48 (8): 1785-1792

Schulz F, Just I, Genth H: Prevention of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin-induced apoptotic cell death by Tauroursodeoxycholic Acid. *Biochemistry*, 2009, 48 (38): 9002-9010

Übersichtsartikel

Genth H, **Schulz F**, Just I: Glucosylation of Rho/Ras proteins by Lethal Toxin - implications of actin-reorganization and apoptosis in *C.sordellii*-associated disease. *The Open Toxinology Journal*, 2009: Accepted for publication.

Tagungsbeiträge (inkl. Meeting Abstracts)

Mainz (Germany), 10th – 12th March 2009, 50th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, I. Just, H. Genth.

Title: *C.sordellii* lethal toxin-induced apoptotic cell death is based on inhibition of phosphoinositide-3 kinase/Akt signalling. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 379: p. 24, 91, Suppl. 1 April 2009

Mainz (Germany), 10th – 12th March 2009, 50th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

M. Lica, **F. Schulz**, J. Huelsenbeck, I. Just, H. Genth.

Title: Difference in the cytotoxic effects of Toxin B from *Clostridium difficile* in proliferating and non-proliferating cells. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 379: p. 24, 92, Suppl. 1 April 2009

Freiburg (Germany), 28th February – 1st March 2009, 3rd Schauinsland-Meeting, DFG Priority Program SPP 1150: Signal Pathways to the Cytoskeleton and Bacterial Pathogenesis

F. Schulz

Title: TUDCA prevents the cytotoxic effects of *Clostridium sordellii* lethal toxin

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

J. Huelsenbeck, S.C. Dreger, **F. Schulz**, M. Gaestel, I. Just, G. Fritz, H. Genth.

Title: Upregulation of the immediate-early gene product RhoB by the Ras-glucosylating *Clostridium sordellii* lethal toxin. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 97, Suppl. 1 March 2008

Publikationen

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

M. May, **F. Schulz**, I. Just, H. Genth.

Title: Difference in the formation of multi-nuclei induced by *Clostridium difficile* toxin B from strain VPI10463 and strain 1470. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 98, Suppl. 1 March 2008

Braunschweig (Germany), 11th December 2008, Helmholtz International Research School for Infection Biology, 2nd International PhD Symposium.

F. Schulz, I. Just, H. Genth

Title: *Clostridium sordellii* lethal toxin induced apoptotic cell death is based on inhibition of the phosphoinositide-3 kinase/Akt signalling.

Goslar (Germany), 28th September – 2nd October 2008, Hannover Biomedical Research School: Summer School "Signaling and Immunity".

F. Schulz, I. Just, H. Genth.

Title: Inactivation of PI 3-kinase is a critical intermediate step in TcsL-induced apoptotic cell death.

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, M. May, I. Just, H. Genth.

Title: Programmed cell death induced by *Clostridium sordellii* lethal toxin in macrophage-like J774A.1 cells. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 98, Suppl. 1 March 2008

Mainz (Germany), 13th – 15th March 2007, 48th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, J. Huelsenbeck, R. Gerhard, A. Kotlyarov, G. Fritz, I. Just, H. Genth.

Title: p38 MAP kinase and the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxin B. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 371: p. 38, 149, Suppl. 1 March 2007

Mainz (Germany), 15th – 17th March 2005, 46th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, J. Huelsenbeck, I. Just, H. Genth.

Title: The catalytic domain of native large clostridial cytotoxins escapes antitoxin detection. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 371: p. 117, 491, Suppl. 1 February 2005

Zusammenfassung

Das letale Toxin (TcsL) und das hämorrhagische Toxin (TcsH) stellen die Hauptpathogenitätsfaktoren von *Clostridium sordellii* dar. *C. sordellii* ist ein Auslöser von Myonekrose (Gasbrand) und nekrotisierender Fasciitis. TcsL mono-glucosyliert und inaktiviert dadurch niedermolekulare GTP-bindende Proteine der Rho- und Ras-Familie. Daraus resultiert eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts („zytopathischer Effekt“) sowie die Initiation von Apoptose. Die Inaktivierung von H/K/N-Ras führt zu einer Hemmung von Signalwegen, die das zelluläre Überleben regulieren, wie dem Raf/ERK-, dem RacGEF/Rac- oder dem PI3K/Akt-Signalweg. Diese Arbeit beruht auf der Hypothese, dass die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose ist. In dieser Arbeit wird die anti-apoptotische Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) als pharmakologisches Werkzeug genutzt, um den PI3K/Akt-Signalweg unabhängig von H/K/N-Ras zu aktivieren.

Die Glucosylierung von H/K/N-Ras durch TcsL induziert die Dephosphorylierung (Inaktivierung) von Akt. Die TcsL-induzierte Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges lässt sich durch TUDCA-Behandlung aufheben, da TUDCA die TcsL-induzierte Akt-Dephosphorylierung verhindert. TUDCA unterdrückt zudem die TcsL-induzierte Apoptose, wie anhand der Endpunkte Caspase-3-Aktivierung, Phosphatidylserin-externalisierung und Reduktion der metabolischen Aktivität (WST-1-Test) gezeigt wird. Der anti-apoptotische Effekt von TUDCA wird sowohl durch den PI3K-Inhibitor LY294002 als auch den Akt-Inhibitor aufgehoben. Dies zeigt, dass der anti-apoptotische Effekt von TUDCA PI3K/Akt-anhängig ist.

Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) ähneln TcsL bezüglich Struktur und Funktion, glucosylieren aber ausschließlich niedermolekulare GTP-bindende Proteine der Rho-Familie. TUDCA entfaltet weder in TcdA- noch in TcdB-behandelten Zellen eine anti-apoptotische Wirkung. Somit war der anti-apoptotische Effekt von TUDCA für TcsL, d.h. für ein Ras-glucosylierendes Toxin, spezifisch.

Zellen reagieren auf die Inaktivierung Rho/Ras-abhängiger Überlebenssignalwege durch TcdA, TcdB und TcsL mit einer Aktivierung der p38 MAP Kinase (p38 MAPK). Die p38 MAPK-Aktivität ist kritisch für die Toxin-induzierte Apoptose, da die Hemmung der p38 MAPK durch SB203580 vor Apoptose schützte. Die p38 MAPK wirkte somit in diesem System pro-apoptotisch. TUDCA stellt derzeit ein in den USA zugelassenes Pharmakon zur Behandlung von Gallensteinen dar. Weiterhin wird ein therapeutischer Nutzen bei Apoptose-assoziierten Erkrankungen wie z.B. neuro-

Zusammenfassung

degenerativen Erkrankungen erprobt. Die gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass TUDCA auch zur Behandlung von Erkrankungen geeignet sein könnte, die durch toxische *C. sordellii* ausgelöst werden.

Schlagworte:

Phosphoinositid-3-Kinase, *Clostridium sordellii* Letales Toxin, p38 MAPK

Abstract

Lethal Toxin (TcsL) and hemorrhagic toxin (TcsH) are the main pathogenicity factors of *Clostridium sordellii*. *C. sordellii* is associated with myonecrosis and necrotizing fasciitis. TcsL mono-glucosylates and thereby inactivates low molecular weight GTP-binding proteins of the Rho- and Ras-family, resulting in actin-reorganization ("cytopathic effect") and apoptosis induction. Inactivation of H/K/N-Ras inhibits cellular survival pathways like Raf/ERK, RalGEF/Ral or PI3K/Akt. This study is based on the hypothesis, that inhibition of the PI3K/Akt-survival pathway is critical for TcsL-induced apoptosis. In this study, the anti-apoptotic bile acid tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) was applied as pharmacological tool to activate the PI3K/Akt-pathway independently of H/K/N-Ras.

Glucosylation of H/K/N-Ras by TcsL induced de-phosphorylation (inactivation) of Akt. The TcsL-induced inhibition of the PI3K/Akt-pathway was prevented by TUDCA because TUDCA blocked TcsL-induced Akt de-phosphorylation. Furthermore, TUDCA prevented TcsL-induced apoptosis as shown by activation of caspase-3, phosphatidylserine-exposure, and reduction of metabolic activity (WST-1-test). The anti-apoptotic effect of TUDCA was abolished by the PI3K-inhibitor LY294002 and the Akt-inhibitor. Thus, the anti-apoptotic properties of TUDCA depended on PI3K/Akt-activity.

Toxin A (TcdA) and Toxin B (TcdB) are related to TcsL concerning structure and catalytic activity. In contrast to TcsL, TcdA and TcdB specifically glucosylate low molecular weight GTP-binding proteins of the Rho-family but not of the Ras-family. TUDCA was neither capable of preventing apoptosis in TcdA- nor in TcdB-treated cells. Thus, the anti-apoptotic effect of TUDCA was specific for the Ras-glucosylating TcsL.

Inactivation of Rho-/Ras-dependend cellular survival pathways by TcdA, TcdB, and TcsL is accompanied by activation of the p38 MAP kinase (p38 MAPK). Inhibition of p38 MAPK by SB203580 prevented toxin-induced apoptosis, indicating the critical pro-apoptotic role of p38 MAPK. In the US, TUDCA is approved as a gallstone preventative. Due to its anti-apoptotic activity, TUDCA is under investigation for its potential as a therapeutic modulator of apoptosis-related diseases, e.g. of neurodegenerative diseases. This study suggests that TUDCA may represent a new concept for the treatment of diseases associated with toxigenic *C. sordellii*.

Keywords: Phosphoinositide 3-kinase, *Clostridium sordellii* Lethal Toxin, p38 MAPK

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Clostridium sordellii</i>	1
1.2 <i>Clostridium difficile</i>	1
1.3 Clostridiale glucosylierende Toxine	1
1.4 Niedermolekulare GTP-bindende Proteine	4
1.5 Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen durch clostridiale glucosylierende Toxine	5
1.6 Wirkungen clostridialer glucosylierender Toxine auf kultivierte Zellen	6
1.7 Ras-abhängige Signalwege	7
1.8 Phosphoinositid-3-Kinase-abhängige Signalwege	8
1.9 Rolle der p38 MAPK in der Wirkung clostridialer glucosylierender Toxine	9
1.10 Gallensäuren	10
1.10.1 Pro-apoptotische Gallensäuren	12
1.10.2 Anti-apoptotische Gallensäuren	12
1.10.3 Anwendung der anti-apoptotischen Gallensäuren in der Medizin	14
2. Projektziele	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	16
3.3 Präparation von Toxinen	17
3.4 Expression und Aufreinigung von rekombinanten GTPasen aus E.coli	18
3.5 Zellkultur	18
3.6 Western-Blot	19
3.7 [¹⁴ C]-Glucosylierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen	19
3.8 Anfärbung apoptotischer Zellen mittels AnnexinV	19
3.9 Viabilitätsbestimmung mittels WST-1-Test	20
3.10 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	20
3.11 Densitometrische Signalauswertung	21
3.12 Statistische Auswertung	21
4. Ergebnisse	22
4.1 Anti-apoptotischer Effekt von TUDCA in TcsL-induzierter Apoptose	22
4.2 Identifikation der Ursache des anti-apoptotischen Effektes von TUDCA	24
4.3 TUDCA induziert die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges	33
4.4 Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges durch TUDCA reduziert die TcsL-induzierte Expression von pro-apoptotischem RhoB	34
4.5 Keine Hemmung der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose durch TUDCA	35
4.6 Keine Hemmung der Glucosyltransferaseaktivität von TcdA und TcdB auf zellularer Ebene durch TUDCA	37
4.7 Rolle der p38 MAPK in TcdA - und TcsL-induzierter Apoptose	38
4.8 Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TUDCA	42
4.9 Hemmung des PI3K/Akt Signalweges durch SB203580	43

Inhaltsverzeichnis

4.10 Anti-apoptotische Wirkung von TUDCA in HeLa-Zellen und Fibroblasten	44
4.11 Wirkung von TUDCA auf die TcsL-induzierte Aktin-Reorganisation	46
5. Diskussion	48
5.1 Kritische Rolle der H/K/N-Ras-Glycosylierung in TcsL-induzierter Apoptose	48
5.2 Wirkung von TUDCA auf den PI3K/Akt-Signalweg	49
5.3 Kritische Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der TcsL-induzierten Apoptose	50
5.4 Mögliche (hemmende) Effekte von TUDCA auf die Aktivität von TcsL	51
5.5 Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges durch TcsL	52
5.6 Keine Hemmung TcdA/TcdB-induzierter Apoptose durch TUDCA	53
5.7 Aktivierung der p38 MAPK durch clostridiale glycosylierende Toxine	54
5.8 Pro-apoptotische Rolle der p38 MAPK in der Apoptose clostridialer glycosylierender Toxine	55
5.9 Pleiotrophe Effekte von SB203580 und TUDCA	55
5.10 Möglicher Beitrag der TcsL-induzierten Apoptose in der <i>C. sordellii</i> -assoziierten Erkrankung	57
6. Ausblick	59
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Literaturangaben	63
9. Curriculum Vitae	70

1. Einleitung

1.1 *Clostridium sordellii*

C. sordellii ist ein anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Infektionen mit *C. sordellii* können bei offenen Wunden vermehrt nach der Geburt, bei gynäkologischer Behandlung oder durch Spritzen von Drogen auftreten, sind aber beim Menschen selten (Aldape *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2004, Sinave *et al.*, 2002). *C. sordellii* ist ein Auslöser von Myonekrose (Gasbrand) und nekrotisierender Fasciitis, oft begleitet von einem toxischen Schock. Klinische Symptome sind Übelkeit, Schwindel, Lethargie, Hypotonie und Herzrasen (Genth *et al.*, 2009). Bei Schafen und anderen Nutztieren löst TcsL hämorrhagische Enteritis, Enterotoxämie sowie Myonekrosen aus (Manteca *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2000) und kann zu plötzlichem Tod führen (Lewis & Naylor, 1998). Pathogene *C. sordelli*-Stämme produzieren verschiedene Virulenzfaktoren: Das letale Toxin (TcsL), das hämorrhagische Toxin (TcsH), ein Hemolysin, eine DNase, eine Collagenase und eine Lysolecithinase.

1.2 *Clostridium difficile*

C. difficile ist ebenfalls ein anaerobes, sporenbildendes Bakterium. Die Hauptpathogenitätsfaktoren Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) sind der Auslöser der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe und der pseudomembranösen Colitis (Kelly *et al.*, 1994; Kelly & Lamont, 1998; Bartlett *et al.*, 1994). Diese Erkrankungen werden durch Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika begünstigt, da diese eine Schädigung der physiologischen Flora des Dickdarms auslösen und dadurch eine Besiedlung mit dem sporenbildenden Bakterium *C. difficile* erleichtern (Just & Gerhard, 2004).

1.3 Clostridiale glycosylierende Toxine

TcsL, TcsH, TcdA und TcdB werden aufgrund ihrer inhärenten Glucosyltransferaseaktivität als „Clostridiale glycosylierende Toxine“ klassifiziert (Genth *et al.*, 2008; Jank & Aktories, 2008; Aktories & Just, 2005). Früher trug diese Toxinfamilie den Namen „Große Clostridiale Zytotoxine“ (Just & Gerhard, 2004). Alle Mitglieder dieser Toxinfamilie weisen eine hohe Ähnlichkeit auf Aminosäureebene auf (Busch & Aktories, 2000). Die Toxine sind einkettige Proteine mit molekularen Massen

Einleitung

zwischen 270 und 308 kDa (Schirmer & Aktories, 2004). Sie bestehen aus einer N-terminal lokalisierten Glucosyltransferasedomäne (A) und einer Transportdomäne (B) (Abb. I) und werden daher als AB-ähnliche Toxine klassifiziert. Die Transportdomäne ermöglicht die Aufnahme des Toxins in die Zelle durch rezeptorvermittelte Endozytose (Abb. II). Die Transportdomäne gliedert sich in eine C-terminale Rezeptorbindedomäne, eine Transmembrandomäne und eine Cysteinprotease-domäne (Abb. I). Die Rezeptorbindedomäne besteht aus repetitiven Peptidelementen (combined repetitive oligopeptides = CROPs) (Von Eichel-Streiber *et al.*, 1993), die eine Bindung an bestimmte Zuckerstrukturen ermöglichen. Die rezeptorvermittelte Endozytose wird durch Bindung der Rezeptorbindedomäne des Toxins an einen derzeit noch nicht identifizierten Rezeptor an der Zelloberfläche eingeleitet. Anschließend schnürt sich ein Toxin-haltiges Vesikel von der Membran ab, das zu einem Endosom prozessiert wird. Über eine Ansäuerung durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe auf etwa pH 5 wird eine Konformationsänderung des Toxins eingeleitet (Qa'Dan *et al.*, 2000). Durch die gesteigerte Hydrophobizität lagert sich das umgefaltete Toxin in die endosomale Membran ein. Die Transmembrandomäne erzeugt eine Pore bzw. einen Kanal (Barth *et al.*, 2001), durch welche die N-terminale Glucosyltransferasedomäne in das Zytosol freigesetzt wird (Rupnik *et al.*, 2005; Pfeifer *et al.*, 2003). Die Abspaltung der Glucosyltransferasedomäne wird durch eine Cysteinprotease vermittelt (Egerer *et al.*, 2007) und durch den eukaryotischen Faktor Inositolhexaphosphat (InsP₆) der Wirtszelle unterstützt (Reineke *et al.*, 2007; Egerer *et al.*, 2009). Für TcdB wurde gezeigt, dass ein Motiv bestehend aus den Aminosäuren Asp587, His653 und Cys698 (DHC-Motiv) für die Spaltung essentiell ist (Egerer *et al.*, 2007). Das DHC-Motiv ist in allen clostridialen glucosylierenden Toxinen konserviert. Die freigesetzte Glucosyltransferasedomäne katalysiert im Zytosol die Glucosylierung von niedermolekularen GTP-bindenden Proteinen der Rho- und Ras-Unterfamilien. Das DXD-Motiv bestehend aus zwei Asparaginsäureresten, die eine aliphatische Aminosäure umgeben, bindet in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen das Co-Substrat UDP-Glucose und ist für die Glucosyltransferaseaktivität essentiell (Busch *et al.*, 1998).

Einleitung

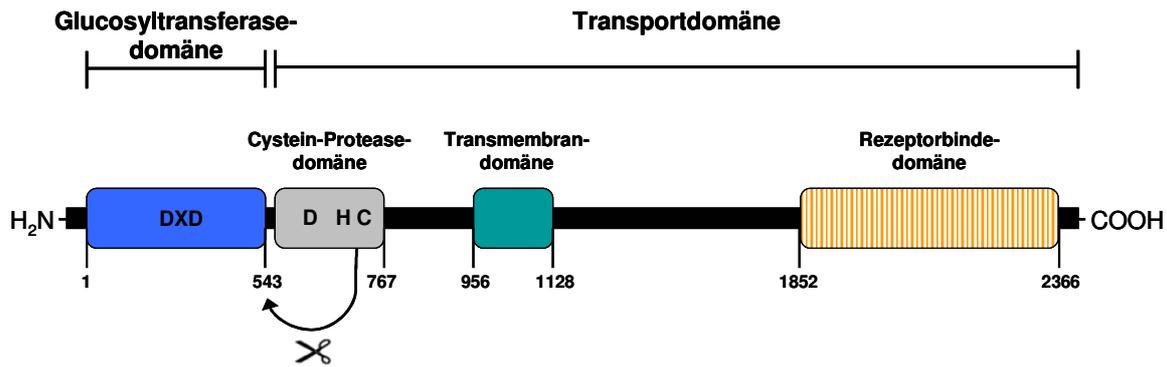


Abb. I: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus clostridialer glucosylierender Toxine am Beispiel von TcdB.

Das einkettige TcdB ist ein AB-Toxin mit einer C-terminalen Transportdomäne und einer N-terminalen Glucosyltransferasedomäne. Die Transportdomäne unterteilt sich in eine Rezeptorbindedomäne, eine Transmembrandomäne und eine Cysteinproteasedomäne. Asp587, His653 und Cys698 (DHC) sind essentiell für die katalytische Aktivität der Cysteinproteasedomäne, welche die Abspaltung der Glucosyltransferasedomäne ermöglicht. Das DXD-Motiv aus Asp286, einer beliebigen Aminosäure und Asp288 ist entscheidend an der Bindung und Koordination des Co-Substrates UDP-Glucose beteiligt. (Modifiziert nach Genth *et al.*, 2008).

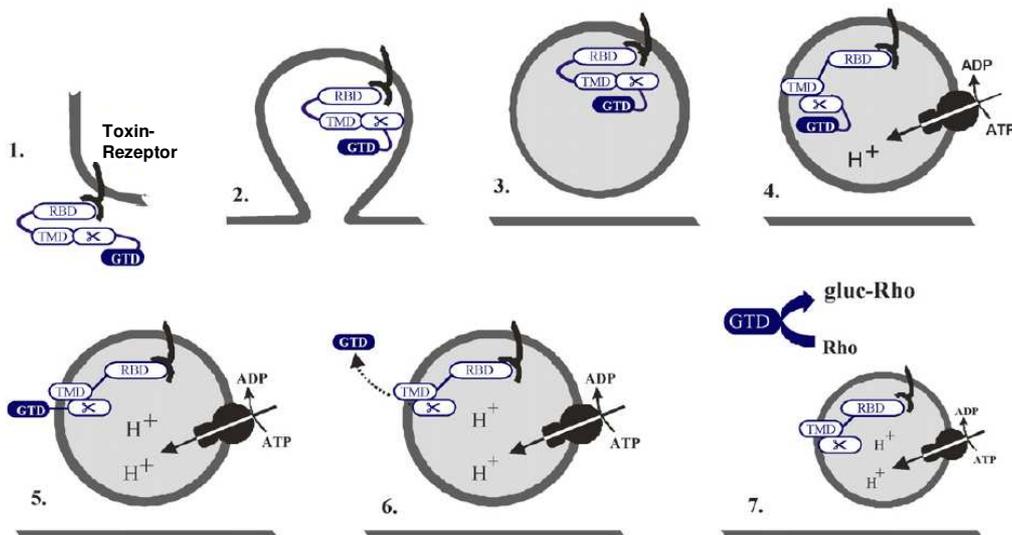


Abb. II: Schematische Darstellung der Zellaufnahme clostridialer glucosylierender Toxine durch rezeptorvermittelte Endozytose.

Die Rezeptorbindedomäne (RBD) des Toxins bindet zunächst an einen Rezeptor an der Zelloberfläche (1.). Anschließend schnürt sich die Membran ein (2.), wobei das Toxin internalisiert wird. Das Toxin-enhaltende Vesikel wird folgend zu einem Endosom prozessiert (3.) und über eine ATP-abhängige Protonenpumpe angesäuert (4.). Dieses führt zu einer Konformationsänderung, wodurch sich die Transmembrandomäne (TMD) in die endosomale Membran einlagern kann und dort eine Pore erzeugt (5.). Die Cysteinproteasedomäne (") spaltet die Glucosyltransferasedomäne (GTD) ab und ermöglicht so deren Freisetzung in das Zytosol (6.). Dort vermittelt die GTD die Glucosylierung von niedermolekularen GTP-bindenden Proteinen. (Adaptiert von Genth *et al.*, 2008).

1.4 Niedermolekulare GTP-bindende Proteine

Die Familie niedermolekularer GTP-bindender Proteine umfasst mehr als 150 Mitglieder mit molekularen Massen zwischen 18 und 26 kDa. Aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeit können die 5 Subfamilien Ras, Rho, Rab, Ran und Arf unterschieden werden (Wennerberg *et al.*, 2005). Niedermolekulare GTP-bindende Proteine sind intrazellulär an der Regulation zahlreicher Prozesse beteiligt. Ras-Proteine regulieren die Genexpression bestimmter Proteine und sind an der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt. Rho-Proteine vermitteln die Modulation des Aktinzytoskeletts und die Zellzyklusprogression. Rab, Ran und Arf regulieren den Transport von Proteinen und Vesikeln.

Niedermolekulare GTP-bindende Proteine sind molekulare Schalter und wechseln zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form (Hall & Nobes, 2000). Dieser Zyklus niedermolekularer GTP-bindender Proteine (Abb. III) wird durch drei Regulatorproteine gesteuert. Guanidinnukleotid-austauschfaktoren (GEF) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP. Die GTP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung sowohl in der switch I-Region, welche für die Effektorbindung verantwortlich ist, als auch in der switch II-Region, welche die GTP-Hydrolyse vermittelt (Wittinghofer & Pai; 1991, Fujisawa *et al.*, 1998). In der GTP-gebundenen Form sind Rho- und Ras-Proteine aktiv, d.h. sie binden und aktivieren dadurch Effektorproteine (Schmidt & Hall, 2002). Die Effektorproteine umfassen Serin-, Threonin- und Tyrosin-abhängige Kinasen, Lipidkinasen, Lipasen, Oxidasen und Adapterproteine (Jaffe & Hall, 2005). Die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) stimulieren die intrinsische Hydrolyseaktivität, wodurch gebundenes GTP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe in GDP überführt und die GTPase inaktiviert wird (Bernards, 2003). Die Guanidinnukleotiddissoziationsinhibitoren (GDI) verhindern durch Komplexbildung den Nukleotidaustausch und stabilisieren die GDP-gebundene, inaktive Form im Zytosol (Olofsson, 1999).

Niedermolekulare GTP-bindende Proteine werden posttranslational modifiziert (Wennerberg *et al.*, 2005). Die meisten Ras-Proteine werden entweder durch Geranylgeranyl-Transferasen oder Farnesyl-Transferasen an einem Cysteinrest des C-terminalen CAAX-Motiv (C=Cys, A=aliphatische Aminosäure, X=beliebige Aminosäure) isoprenyliert (Cox und Der, 2002). Diese Modifikationen vermitteln die Membranassoziation und die subzelluläre Verteilung der GTPasen (Wennerberg *et al.*, 2005). Eine weitere Funktion von GDI-Proteinen ist die Maskierung des

Einleitung

Isoprenylrestes in Rho- und Rab-Proteinen. Dadurch wird die Membranassoziation verhindert (Wennerberg *et al.*, 2005).

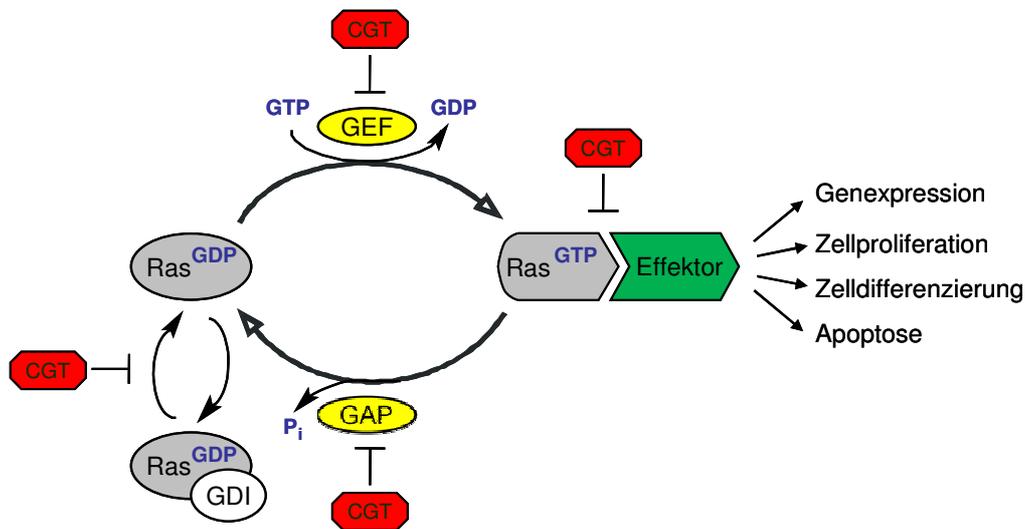


Abb. III: Einwirkung clostridialer glucosylierender Toxine auf den Zyklus niedermolekularer GTP-binder Proteine am Beispiel von Ras.

Ras wechselt zwischen einer GTP-gebundenen, aktiven und einer GDP-gebundenen, inaktiven Konformation. In der aktiven Form erfolgt die Interaktion mit Effektorproteinen, was die Regulation intrazellulärer Prozesse ermöglicht. Guanidinnucleotiddissoziationsinhibitoren (GDI) stabilisieren durch Komplexbildung den inaktiven Zustand. Guanidinnucleotidaustauschfaktoren (GEF) katalysieren den Austausch von GDP durch GTP und aktivieren dadurch niedermolekulare GTP-bindende Proteine. Die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) beschleunigen die intrinsische Hydrolyseaktivität der niedermolekularen GTP-bindenden Proteine, wodurch wieder die inaktive Konformation eingenommen wird. Clostridiale glucosylierende Toxine (CGT) entkoppeln niedermolekulare GTP-bindende Proteine von ihren Effektoren und Regulatorproteinen und verhindern so die distale Signalweitergabe.

1.5 Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen durch clostridiale glucosylierende Toxine

Clostridiale glucosylierende Toxine inaktivieren kleine GTP-bindende Proteine der Ras- und Rho-Familie durch Mono-Glucosylierung (Abb. IV). Dabei bildet das Toxin zunächst einen Komplex, in dem das Proteinsubstrat und das Co-Substrat UDP-Glucose in einer reaktionsfähigen Position koordiniert werden. Danach erfolgt die Übertragung des Glucoserestes auf die GTPase durch O-glucosidische Verknüpfung (Just & Gerhard, 2004). Die Reaktion verläuft unter Retention der α -anomeren Konfiguration des C1-Atoms des Glucoserestes (Geyer *et al.*, 2003; Vetter *et al.*, 2000). Die Akzeptoraminosäure ist ein hoch konservierter Threoninrest in der Effektorregion der GTPase und stellt Thr35 in Ras, Rac1, RhoG und Cdc42 sowie Thr37 in RhoA dar (Genth *et al.*, 2008; Jank *et al.*, 2007). Nach erfolgter Glucosylierung dissoziiert der Komplex unter Freisetzung der glucosylierten GTPase

Einleitung

sowie UDP. Die Glucosylierung blockiert die Kopplung der Rho/Ras-Proteine mit ihren Effektor- und Regulatorproteinen (Abb. III) und führt somit zu einer funktionellen Inaktivierung (Sehr *et al.*, 1998; Hermann *et al.*, 1998; Genth *et al.*, 1999). Die glucosylierenden Toxine unterscheiden sich in ihrer Proteinsubstratspezifität: Während TcsL Ras und Rho-Proteine inaktiviert, glucosylieren TcdA, TcdB und TcsH spezifisch Rho-Proteine (Tab. I).

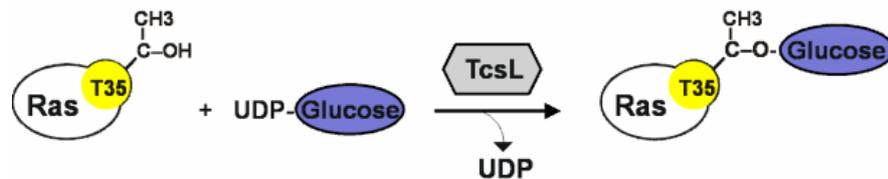


Abb. IV: Mechanismus der Glucosyltransferaseaktivität clostridialer glucosylierender Toxine am Beispiel von TcsL.

TcsL überträgt einen Glucoserest des Co-Substrates UDP-Glucose auf die Akzeptoraminosäure Thr35 von Ras. Das Toxin bildet dabei einen Komplex, in dem eine günstige Orientierung der Reaktanten für den Transfer der Glucoseeinheit vorliegt. Nach erfolgter Übertragung des Zuckers zerfällt der Komplex unter Freisetzung des Toxins, der glucosylierten GTPase und UDP.

Toxin	Rho-Familie	Ras-Familie
TcdA/TcdB/TcsH	Rac1, Cdc42, Rho(A/B/C), RhoG, TC10	-
TcsL	Rac1, RhoG, TC10	H/K/N-Ras, M-Ras, R-Ras, Rap, Ral

Tab. I: Intrazelluläre Substrate von TcdA/TcdB und TcsL

1.6 Wirkungen clostridialer glucosylierender Toxine auf kultivierte Zellen

Clostridiale glucosylierende Toxine induzieren in kultivierten Zelllinien eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts (zytopathischer Effekt). Dieser zytopathische Effekt wird der Rac1-Glucosylierung zugeschrieben (Halabi-Cabezón *et al.*, 2008). Der zytopathische Effekt ist durch morphologische Veränderungen wie der Bildung von Neuriten-ähnlichen Retraktionsfasern gekennzeichnet und endet in einer vollständigen Abrundung der Zelle (Boquet *et al.*, 1998; Just *et al.*, 1995 a, b, 2001). Im Gegensatz zu TcdA- oder TcdB-behandelten Zellen neigen TcsL-behandelte Zellen zusätzlich zur Bildung von Clustern und einem Ablösen von der Oberfläche (Genth *et al.*, 2009; Rupnik, 2008).

Einleitung

Darüberhinaus induzieren die clostridialen glucosylierenden Toxine apoptotischen Zelltod. Es existieren zwei Modelle, wie die Toxine Apoptose induzieren:

1. Die Toxine wirken direkt, d.h. Glucosyltransferase-unabhängig auf die Mitochondrien (z. B. über Porenbildung) (Petit *et al.*, 2003; Matarrese *et al.*, 2007).
2. Die Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen resultiert in der Hemmung kritischer Überlebenssignalwege in der Zelle; dies führt schließlich zur Apoptose (Huelsenbeck *et al.*, 2007a). Unter Verwendung Glucosyltransferase-defizienter Toxine zeigen kürzlich erschienene Studien, dass die Anwesenheit des Toxinmoleküls in der Zelle nicht ausreichend für die Apoptoseinduktion ist, sondern die Glucosyltransferase-aktivität für die Apoptose erforderlich ist (Nottrott *et al.*, 2008; Dreger *et al.*, 2009).

1.7 Ras-abhängige Signalwege

Ras-Proteine regulieren (positiv) Zellwachstum und Zellproliferation und (negativ) die Apoptose (Cox & Der, 2003). Daher sind Ras-Proteine klassische Proto-Onkogene, deren übermäßige Aktivität zur Entstehung von Krebs führen kann. Ras-Proteine werden durch zahlreiche externe Stimuli aktiviert. Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) binden an ihre entsprechende Rezeptortyrosinkinase, die dadurch aktiviert und über das Adapterprotein Grb-2 die Aktivierung von Ras durch den Ras-GEF Sos vermitteln (Disanza *et al.*, 2005). Wichtige Signalwege unterhalb von Ras stellen der Raf/MEK/ERK-, der RalGEF/Ral- und der PI3K/Akt-Signalweg dar. Diese Signalwege regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie NFκB, ELK-1 und AFX, welche die Expression von sowohl pro- als auch anti-apoptotischen Proteinen vermitteln (Cox & Der, 2003). Während der PI3K/Akt-Signalweg (siehe auch 1.8) und die Aktivierung von NFκB anti-apoptotische Wirkungen vermitteln, kann Raf/ERK sowohl anti- als auch pro-apoptotische Effekte vermitteln (Cox & Der, 2003).

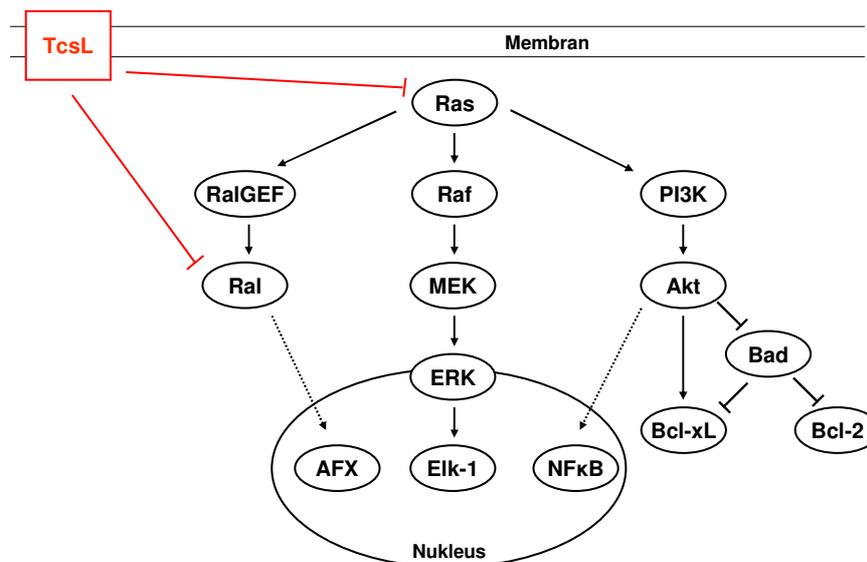


Abb. V: TcsL-induzierte Inaktivierung Ras-abhängiger Signalwege.

Die Inaktivierung von Ras-Proteinen durch TcsL hemmt den RalGEF/Ral-, den Raf/MEK/ERK und den PI3K-Akt-Signalweg. Diese Signalwege regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie ELK-1, AFX und NFκB, welche die Expression pro- und anti-apoptotischer Proteine regulieren. Die Phosphorylierung (Inaktivierung) des pro-apoptotischen Proteins Bad entkoppelt Bad von Bcl-2 und Bcl-xL, welche dann anti-apoptotisch wirken. (Adaptiert von Genth et al. 2009).

1.8 Phosphoinositid-3-Kinase-abhängige Signalwege

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) werden ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert. Als PI3K werden Enzyme bezeichnet, welche die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen zu dem second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ($PI(3,4,5)P_3$) katalysieren (Hawkins *et al.*, 2006). Sie regulieren Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben (Cantley, 2002). PI3K weisen eine große Homologie in ihrer katalytischen Untereinheit auf, unterscheiden sich aber stark in ihrer regulatorischen Untereinheit und anderen Domänen. Daher werden sie in die Klassen I, II und III eingeteilt, von denen die Klasse I PI3K am besten charakterisiert sind. Diese stellen Dimere aus einer p110 (α , β , γ , δ) katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit dar (Hawkins *et al.*, 2006). Ein breites Spektrum von Rezeptoren, die durch Wachstumsfaktoren, pro-inflammatorische Faktoren, Hormone, Neurotransmitter und Antigene aktiviert werden, stimulieren die PI3K. Aktives Ras stimuliert durch direkte Bindung an die p110 Untereinheit die Aktivität der PI3K ebenfalls (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1996; Kodaki *et al.*, 1994). Proteine mit Pleckstrin-homologen (PH) Domänen werden dann durch Bindung an $PI(3,4,5)P_3$ aktiviert. Diese Effektorproteine schließen

Tyrosinkinassen, Serin-/Threoninkinassen und Guanidinnukleotidaustauschfaktoren ein (Cantley, 2002). Ein wichtiges Effektorprotein der PI3K ist die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1), welche die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Akt (Proteinkinase B) vermittelt (Lawlor & Alessi, 2001). Akt phosphoryliert weitere Proteine, die den Zellzyklus, das Zellwachstum und das Überleben der Zelle regulieren. Die meisten dieser Proteine wie z.B. die pro-apoptotischen Proteine Bad oder die Glycogensynthase-Kinase 3 (GSK 3) werden durch Phosphorylierung inaktiviert. Bad komplexiert und inaktiviert dadurch die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bcl-2 und Bcl-X_L. Die Phosphorylierung von Bad durch Akt führt zu einer Freisetzung von Bcl-2 und Bcl-X_L und hemmt daher die Apoptose (Datta *et al.*, 1999). Auch die konstitutiv aktive GSK 3 wird durch Akt-Phosphorylierung gehemmt. Daraus resultiert die Promotion des Zellzyklus durch Stabilisierung von Cyclin D1 und eine Hemmung von Apoptose (Lawlor & Alessi, 2001).

1.9 Rolle der p38 MAPK in der Wirkung clostridialer glucosylierender Toxine

Mitogen-aktivierte Proteinkinassen (MAPK) sind Proteinkinassen mit molekularen Massen von 36 bis 44 kDa dar. Sie regulieren Immunreaktionen, Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie Apoptose (Pearson *et al.*, 2001). Die Hauptgruppen bilden JNK, ERK1/2 und p38 MAPK. ERK wird bevorzugt durch Wachstumsfaktoren aktiviert, während JNK und p38 MAPK sensitiv gegenüber Stress-Stimuli und inflammatorischen Zytokinen sind (Roux & Blenis 2004). Niedermolekulare GTP-bindende Proteine der Rho- und Ras-Unterfamilie aktivieren eine MAPKKK, welche dann über eine Phosphorylierungskaskade die Aktivierung der MAPK auslöst (Dan *et al.*, 2001; Kolch, 2000; Abb. VI). Die Signalweiterleitung distal der p38 MAPK wird durch MAPK-aktivierte Proteinkinassen (MAPKAP oder MK) vermittelt (Gaestel, 2006).

Obwohl die clostridialen glucosylierenden Toxine Rho- und Ras-Proteine inaktivieren, wird die p38 MAPK sowohl in TcdA- und TcdB-behandelten Zellen (Meyer *et al.*, 2007) als auch in TcsL-behandelten Zellen (Geny *et al.*, 2009) aktiviert. Die p38 MAPK ist für die TcdA- und TcdB-induzierte pro-inflammatorische Wirkung in kultivierten Makrophagen essentiell (Meyer *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2005a). Weiterhin hängt auch die TcdA-induzierte Apoptose von der p38 MAPK ab (Kim *et al.*, 2005b).

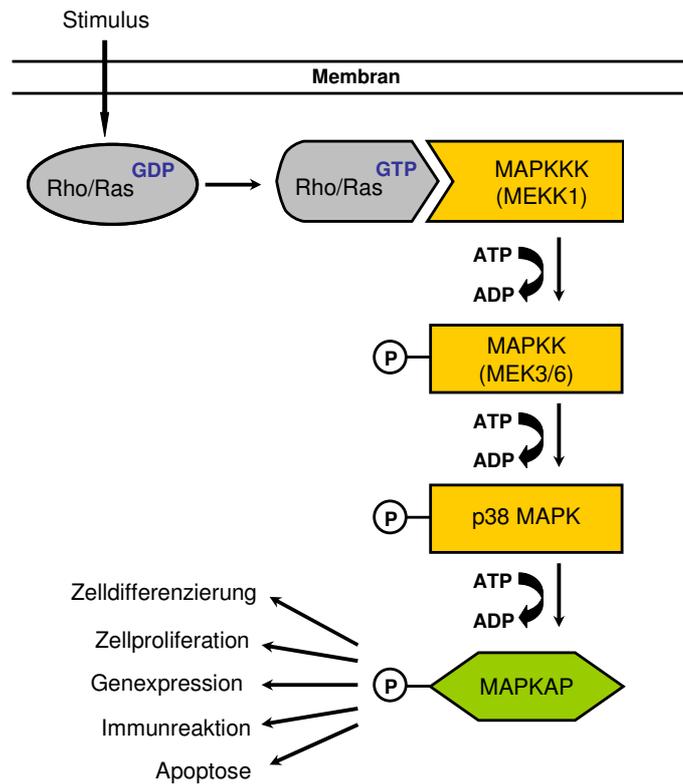


Abb.VI: Modell der Aktivierung der p38 MAPK durch niedermolekulare GTP-bindende Proteine. Die Aktivierung von Rho- und Ras-Proteinen durch extrazelluläre Stimulation ermöglicht die Interaktion des niedermolekularen GTP-bindenden Proteins mit einer MAPKKK. Diese aktiviert über eine Serin-/Threonin-spezifische Phosphorylierungskaskade die p38 MAPK. Intrazelluläre Wirkungen werden distal der p38 MAPK durch MAPKAP's vermittelt.

1.10 Gallensäuren

Gallensäuren sind die Hauptbestandteile der Galle und gehören chemisch zur Gruppe der Steroide (Abb. VII; Amaral et al., 2009). Sie werden in der Leber aus Cholesterol durch Hydroxylierungsreaktionen und eine oxidative Verkürzung der Seitenkette am Ring D synthetisiert (Russell & Setchell, 1992). Die vollständige Synthese von Gallensäuren benötigt 17 Enzyme und wird durch nukleare Hormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren reguliert (Chiang, 2004). Weiterhin unterliegt die Synthese einer negativen Feedback-Hemmung (Amaral et al., 2009). Gallensäuren werden nach erfolgter Synthese in den Darm sezerniert, wo sie die Resorption von Fetten ermöglichen. Gallensäuren sind daher für die Fettverdauung essentiell (Amaral et al., 2009). Die Entdeckung von Gallensäurerezeptoren legt ebenfalls eine Funktion der Gallensäuren als Signalmolekül nahe (Maruyama et al., 2002; Keitel et al., 2008). Man unterscheidet zwei Typen von Gallensäurerezeptoren:

Einleitung

1. Der Gallensäure-Membranrezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Gpbar-1 oder TGR-5), der nach Aktivierung durch Gallensäuren den Energieverbrauch im braunen Fettgewebe und im Skelettmuskel durch Erhöhung des Trijodthyrosinspiegels steigert (Kawamata *et al.*, 2003). Außerdem steigern Gallensäuren Gpbar1-abhängig die Induktion des Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) in den enterochromaffinen Zellen des Darms. Dies weist auf ausgeprägte anti-diabetische Effekte von Gallensäuren durch Stimulation von β -Zellen des Pankreas hin.

2. Der Gallensäure-Kernrezeptor (Farnesoid X-Rezeptor) ist einer von 48 Kernrezeptoren, die (vornehmlich in der Leber) die Expression von Entgiftungsenzymen und Transporterproteinen regulieren. Dieser Mechanismus schützt die Leber unter cholestatischen Bedingungen vor den schädlichen Einflüssen biliärer Bestandteile.

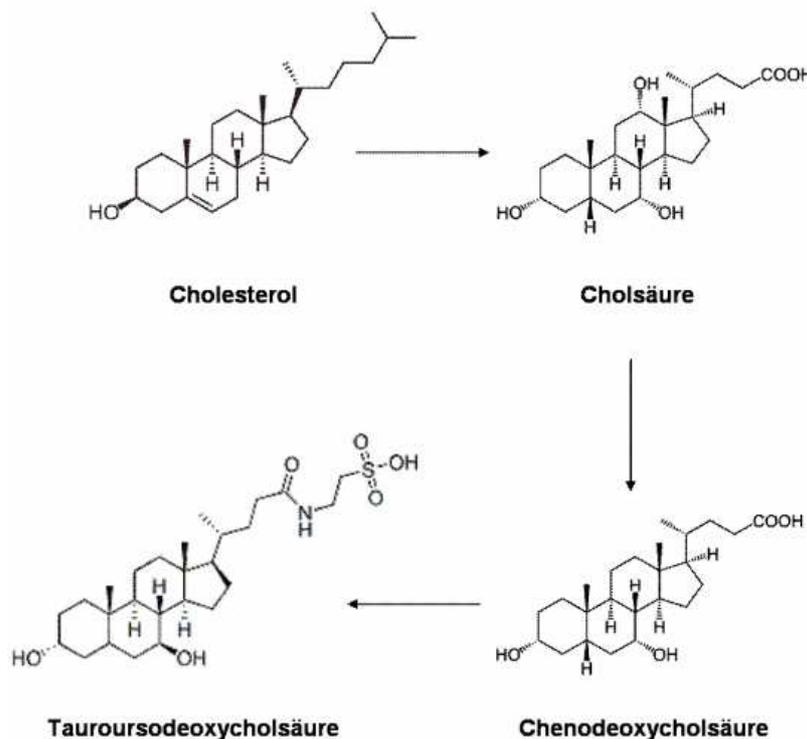


Abb. VII: Synthese von Gallensäuren aus Cholesterol.

Chemisch gehören Gallensäuren zur Gruppe der Steroide und weisen ein Grundgerüst aus 4 polyzyklischen Ringen auf. Gallensäuren werden durch enzymatische Reaktionen aus der Vorstufe Cholesterol gebildet. Cholsäure und Chenodeoxycholsäure sind Beispiele für pro-apoptotische Gallensäuren. Tauroursodeoxycholsäure ist eine anti-apoptotische Gallensäure.

1.10.1 Pro-apoptotische Gallensäuren

In hohen Konzentrationen wirken die meisten (hydrophoben) Gallensäuren zytotoxisch. Gallensäuren können eine Schädigung von Membranen auslösen. Die physiologische Konzentration ist jedoch zu gering, um als Detergenz für Membranen wirksam zu sein. Die Zytotoxizität beruht daher eher auf der Einleitung von oxidativem Stress und Apoptose (Amaral *et al.*, 2009). Gallensäuren induzieren Apoptose sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Signalweg. Der extrinsische Signalweg schließt die Aktivierung von Todesrezeptoren wie Fas und TRAIL sowie die Aktivierung der Initiator-Caspase-8, des pro-apoptotischen Proteins Bid und von Effektor-Caspasen ein (Faubion *et al.*, 1999; Higuchi *et al.*, 2003). Gallensäuren führen ebenfalls zur Generation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und zu einer direkten Schädigung von Mitochondrien auf dem intrinsischen Signalweg (Rodrigues *et al.*, 1998; Yerushalmi *et al.*, 2001). Weiterhin können Gallensäuren eine erhöhte Calciumfreisetzung des endo-plasmatischen Retikulums (ER) induzieren und Calpain-abhängig Apoptose einleiten (Tsuchiya *et al.*, 2006). Die Hemmung der Aktivität von Todesrezeptoren reicht daher allein nicht aus, um Gallensäure-induzierte Apoptose zu verhindern (Rust *et al.*, 2009).

Bei einer Cholestase ist die Sekretion von Gallensäuren in den Darm gehemmt, so dass ein Rückstau in der Leber eintritt. Gallensäuren können dann zu Schädigungen von Leberzellen bis hin zu einer biliären Zirrhose führen (Amaral *et al.*, 2009). Bestimmte Gallensäuren sind aber auch mit einer erhöhten Zellproliferation und der Entstehung von Darmkrebs assoziiert (Bayerdörffer *et al.*, 1993).

1.10.2 Anti-apoptotische Gallensäuren

Ursodeoxycholsäure (UDCA) ist mit ca. 40% der Hauptbestandteil der Galle von Schwarzbären. Beim Mensch ist der Anteil von UDCA mit etwa 2 % dagegen gering (Ramalho *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den meisten anderen Gallensäuren sind UDCA und ihre Konjugate Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) (Abb. VII) sowie Glucoursodeoxycholsäure (GUDCA) anti-apoptotisch und zytoprotektiv wirksam (Solá *et al.*, 2007). Diese anti-apoptotische Wirkung ist verblüffend, da pro- und anti-apoptotische Gallensäuren eine sehr ähnliche chemische Struktur aufweisen. UDCA und ihre Konjugate weisen jedoch im Gegensatz zu den pro-apoptotischen Gallensäuren eine andere Konfiguration der Hydroxyl-Gruppe im Ring B auf

Einleitung

(Abb. VII). Dadurch bleibt diese Hydroxylgruppe in den anti-apoptotischen Gallensäuren frei von intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Gallensäuremolekülen und kann mit Wasser interagieren (Lamcharfi *et al.*, 1997). UDCA und ihre Konjugate werden daher auch als hydrophile Gallensäuren bezeichnet (Amaral *et al.*, 2009). TUDCA weist überdies eine erhöhte Anzahl polarer Gruppen in der Seitenkette auf (Abb. VII). Die anti-apoptotische Potenz der hydrophilen Gallensäuren wird an vielen Faktoren deutlich.

Hydrophile Gallensäuren aktivieren wichtige Überlebens-Signalwege wie den PI3K/Akt-Signalweg (Solá *et al.*, 2003; Schoemaker *et al.*, 2004; Rajesh *et al.*, 2005). TUDCA induziert PI3K-abhängig die Phosphorylierung bzw. Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bad. Dadurch wird die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium sowie die Aktivierung von Caspasen verhindert (Miller *et al.*, 2007). TUDCA wirkt daher zytoprotektiv. UDCA hemmt ebenfalls durch Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren den NF- κ B-Signalweg und wirkt deshalb anti-inflammatorisch (Miura *et al.*, 2001).

UDCA und ihre Konjugate hemmen ebenfalls pro-apoptotische Signalwege. Sie schützen vor der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies, verhindern die Translokation von pro-apoptotischem Bax vom Zytosol zum Mitochondrium und stabilisieren die Mitochondrienmembran. Dieses verhindert die Cytochrom C-Freisetzung und die folgende Aktivierung von Caspasen ebenfalls (Rodrigues *et al.*, 1999, 2003). TUDCA reduziert weiterhin die Calciumfreisetzung aus dem ER (Xie *et al.*, 2002). Möglicherweise wirkt UDCA auch durch Hemmung von p53 anti-apoptotisch (Park *et al.*, 2008).

Der genaue Wirkmechanismus, der den anti-apoptotischen Effekt der hydrophilen Gallensäuren vermittelt, ist derzeit noch nicht bekannt. Das primäre zelluläre Ziel könnten nukleare Steroidrezeptoren sein, welche die Translokation hydrophiler Gallensäuren in den Zellkern vermitteln (Solá *et al.*, 2005). Das Auftreten im Zellkern ist möglicherweise für die anti-apoptotische Wirkung essentiell (Solá *et al.*, 2005). Dort regulieren anti-apoptotische Gallensäuren die Genexpression zahlreicher Proteine, die in Apoptose und Zellzyklus eingebunden sind (Castro *et al.*, 2005).

1.10.3 Anwendung der anti-apoptotischen Gallensäuren in der Medizin

Die anti-apoptotische und zytoprotektive Wirkung der hydrophilen Gallensäuren wird für medizinische Zwecke genutzt. Bären-galle findet seit langer Zeit in der traditionellen chinesischen Medizin Verwendung. In den USA ist UDCA als Arzneistoff zugelassen und wird zur Behandlung primärer biliärer Zyrrose, sklerosierender Cholangitis und anderen cholestatischen Krankheiten eingesetzt (Solá *et al.*, 2007). UDCA besitzt ebenfalls großes Potential in der Bekämpfung weiterer Apoptose-assoziiierter Erkrankungen. Das Taurinkonjugat TUDCA ist in der Lage, in fremdes Gewebe außerhalb der Leber einzudringen und die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Daher wird derzeit die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder der Chorea Huntington mit TUDCA untersucht (Ramalho *et al.*, 2007; Solá *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2002).

2. Projektziele

H/K/N-Ras regulieren eine Vielzahl von Überlebenssignalwegen der Zelle, wie den RalGEF/Ral-, den Raf/ERK oder den PI3K/Akt-Signalweg. Die TcsL-induzierte Ras-Glucosylierung führt zur Hemmung dieser Signalwege. In der Literatur wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Hemmung des Ras/PI3K/Akt-Signalweges kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose ist (Fiorentini *et al.*, 2003, Voth *et al.*, 2007). Der experimentelle Nachweis hierfür stand aus.

Die anti-apoptotische Wirkung der protektiven Gallensäure TUDCA beruht auf einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (auch distal Apoptose-induzierender Stimuli). In dieser Arbeit soll TUDCA als pharmakologisches Werkzeug ausgenutzt werden, um den Nachweis für die kritische Rolle des PI3/Akt-Signalweges zu erbringen. Die Studie wurde in Makrophagen-ähnlichen J774A.1-Zellen durchgeführt, da myeloide Zelllinien eine hohe Sensitivität für die TcsL-induzierte Apoptose zeigen (Petit *et al.*, 2003; Dreger *et al.*, 2009).

Die Schwerpunkte dieser Untersuchung bilden folgende Fragestellungen:

1. Beruht der anti-apoptotische Effekt von TUDCA in TcsL-induzierter Apoptose wirklich auf der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges? Hierzu wird TUDCA in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder dem Akt-Inhibitor eingesetzt.
2. Der anti-apoptotische Effekt von TUDCA könnte auf einer PI3K/Akt-unabhängigen Wirkung auf TcsL beruhen. Hierzu soll untersucht werden, ob TUDCA die TcsL-Aufnahme hemmt oder mit der Glucosyltransferase-Aktivität von TcsL interferiert.
3. TcsL aktiviert die p38 MAP Kinase (Geny *et al.*, 2009). Daher soll eine mögliche Rolle der p38 MAP Kinase in der TcsL-induzierten Apoptose untersucht werden.
4. Die *Clostridium difficile* Toxine TcdA und TcdB glucosylieren spezifisch Rho-Proteine, nicht aber Ras-Proteine. Um die Spezifität der TUDCA-Wirkung auf den PI3K/Akt-Signalweg abzusichern, soll daher ein denkbarer anti-apoptotischer Effekt von TUDCA auf die TcdA-/TcdB-induzierte Apoptose untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Bezeichnung	Hersteller
Akt Inhibitor {1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl- <i>sn</i> -glycerocarbonate}	Calbiochem
Annexin V Alexa Fluor 488	Invitrogen
Anti K-Ras (F234)	Santa Cruz Biotechnology
Anti p38 (A-12) (sc 7972)	Santa Cruz Biotechnology
Anti phospho p38 (Thr180/Tyr182) (28B10)	Cell Signaling
Anti Rac1 (clone 102)	BD Transduction Laboratories
Anti Rac1 (clone 23A8)	Upstate Technologies
Anti Ras (27H5)	Cell Signaling
Anti-beta-actin (clone AC-40)	Sigma
Anti-phospho-Akt (Ser 473) (193H12)	Cell Signaling
Anti-RhoB (C-5) sc8048	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3 Colorimetric Assay	R&D Systems
LY294002 {2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one}	Calbiochem
SB203580 {4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole}	Calbiochem
Sodium tauroursodeoxycholate (TUDCA)	Sigma
Super-Signal West Femto	Pierce
WST-1 {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate}	Roche

3.2 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotpuffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Glucosylierungspuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 100 mM KCl 1 mM MnCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 100 µg/ml BSA
Hochsalzpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl
Laufpuffer (SDS-Gele)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lämmli-Probenpuffer (5x)	100 mM Tris 10 % (w/v) SDS 4 M Glycin 2 g/l Bromphenolblau 500 mM DTT
Luria-Bertani (LB) Medium	1 % NaCl 1 % Bacto Trypton 0,5 % Bacto Yeast
PBS	137 mM NaCl 3 mM KCl 6,6 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TBST	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % (w/v) Tween 20
Thrombinspaltpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂ 2,5 mM CaCl ₂
Tiefsalzpuffer	50 mM Tris 50 mM NaCl

3.3 Präparation von Toxinen

TcdA sowie TcdB wurden aus dem *Clostridium difficile* Stamm VPI 10463 und TcsL aus dem *Clostridium sordellii* Stamm 6018 aufgereinigt. In einem Dialyseschlauch wurden 900 ml 0,9 % NaCl in einem Gesamtvolumen von 4 l Brain-Heart-Infusion-Medium (Difco) vorgelegt und mit jeweils 100 ml einer Über-Nacht-Kultur von *C. difficile* bzw. *C. sordellii* angeimpft. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 72 h unter mikroanaeroben Bedingungen. Die Proteine aus dem Kulturüberstand wurden durch Ammoniumsulfatfällung (70 % Sättigung) präzipitiert. Anschließend erfolgte eine Dialyse gegen Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) über Nacht. Die Toxine wurden auf eine MonoQ-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 800 mM eluiert. Abschließend erfolgte eine Dialyse gegen einen Puffer mit 50 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl (pH 7,5).

3.4 Expression und Aufreinigung von rekombinanten GTPasen aus *E.coli*

Rac1 und H-Ras wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert. Hierzu wurde eine Vorkultur mit den entsprechenden Keimen in LB-Medium (20 ml + 0,05 mg/ml Ampicillin) bei 37 °C über Nacht inkubiert. 5 ml der Vorkultur wurden in eine 1 l Hauptkultur übergeimpft und bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (Extinktion bei 600 nm) von 0,5 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von IPTG (50 µM) induziert. Nach Inkubation bei 37 °C für 4 h wurde das Zellpellet mittels Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min gewonnen. Das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte unter Verwendung der French press bei 1000 psi. Das erhaltene Lysat wurde einer Ultraschallbehandlung unterzogen und die lösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 20000 rpm für 30 min gewonnen. Die GST-Fusionsproteine in der löslichen Fraktion wurden mittels Affinitätschromatographie an Glutathion Sepharose Beads extrahiert. Die Beads wurden ausführlich mit Tief- und Hochsalzpuffer (pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Beads in Thrombinspaltpuffer (+ 1 U/ml Thrombin) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden einer Zentrifugation unterzogen und die im Überstand gelösten Proteine bei -80 °C eingefroren.

3.5 Zellkultur

Makrophagen-ähnliche J774A.1-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom; + 10 % FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 µg/ml Penicillin sowie 100 U/ml Streptomycin) bei 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. HeLa-Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten wurden unter gleichen Bedingungen in DMEM (GIBCO; + 10 % FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 µg/ml Penicillin sowie 100 U/ml Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich passagiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und einer Behandlung mit Trypsin/EDTA unterzogen. Die abgelösten Zellen wurden in Medium suspendiert und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellanzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für Western-Blot-Analysen und Caspase-Assay wurden 2*10⁵ Zellen pro 3,5 cm²-Schale ausgesät. Für die AnnexinV-Färbung bzw. den WST-1-Test wurde eine Zelldichte von 10⁶ Zellen pro 24-Loch-Platte bzw. 96-Loch-Platte verwendet.

3.6 Western-Blot

Die Zellen wurden direkt in Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die erhaltene Suspension wurde bei 37 °C für 10 min inkubiert und folgend einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Es folgte eine Inkubation bei 95 °C für 10 min. Anschließend wurden die vollständig denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und durch das Tankblotverfahren auf Nitrocellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau-S-Färbung überprüft. Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden durch Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST für 1 h abgesättigt. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C. Die Bindung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt. Die Proteindetektion erfolgte durch Chemolumineszenz mittels Super-Signal West Femto-Lösung an der Kodak-Image-Station.

3.7 [¹⁴C]-Glucosylierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen

Zur Bestimmung der Glucosyltransferaseaktivität der clostridialen glucosylierenden Toxine wurde eine [¹⁴C]-Glucosylierung von Rac1 im zellfreien System durchgeführt. Hierzu wurde rekombinantes Rac1 (1 µM) in Glucosylierungspuffer (pH 7,2) in der Gegenwart von 10 µM UDP-[¹⁴C]Glucose mit TcsL versetzt. Nach 20 min Inkubation bei 37 °C wurde die Glucosylierungsreaktion durch Zusatz von Laemmli-Puffer abgestoppt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und der Einbau von [¹⁴C]Glucose in Rac1 mittels Autoradiographie (Phosphor-Imager) bestimmt.

3.8 Anfärbung apoptotischer Zellen mittels AnnexinV

J774A.1-Zellen wurden mit clostridialen glucosylierenden Toxinen oder Inhibitoren behandelt. Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mittels AnnexinV-Alexa-Fluor 488 (Anregung: 470 ± 20 nm; Emission: 515 nm). Das nicht-zellgängige AnnexinV bindet spezifisch an Phosphatidylserinreste der Membran, die in viablen Zellen ausschließlich an der Membrannenseite auftreten und im Frühstadium der Apoptose externalisiert werden. Die Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Detektion. Für die Anfärbung wurden 1 h vor der Aufnahme der Bilder 4 µl AnnexinV-Alexa-Fluor 488 in 400 µl Medium eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopischen

Material und Methoden

Aufnahmen und die zugehörigen Phasenkontrastbilder wurden mittels eines Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Die Apoptoserate wurde durch Auszählung bestimmt und gibt den prozentualen Anteil von AnnexinV-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen wieder.

3.9 Viabilitätsbestimmung mittels WST-1-Test

Die Viabilität der Zellen wurde colorimetrisch mittels WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) bestimmt. WST-1 wird durch zelluläre Dehydrogenasen zu Formazan reduziert, was einen Farbumschlag auslöst. Je stärker die Färbung ausgeprägt ist, desto viabler ist die Zelle. Umgekehrt zeigt eine geringe Färbung den Verlust der Viabilität durch den fortschreitenden Zelltod an. Für den WST-1-Test wurden die Zellen mit den clostridialen glucosylierenden Toxinen und/oder Inhibitoren behandelt. Nach 24 h wurde WST-1 (Roche) im Verhältnis 1:100 direkt dem Medium hinzugefügt. Die Reduktion von WST-1 zu Formazan wurde photometrisch bei 450 nm nach 1 h mittels eines BioTek Synergy 4 quantifiziert. Die Viabilität unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt. Alle weiteren Messwerte wurden relativ hierzu angegeben.

3.10 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3-Aktivität wurde photometrisch durch den Caspase-3 Colorimetric Assay (R&D Systems) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. J774A.1-Zellen wurden mit den clostridialen glucosylierenden Toxinen und/oder Inhibitoren behandelt. Die Zellen einer 3,5 cm² Schale wurden in 75 µl Lysepuffer aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde bei 10.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Es wurden 60 µl des Überstandes für den Assay eingesetzt und mit 6 µl DEVD-pNA-Substratlösung versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 3 h wurde die Freisetzung des Reporters pNA bei 405 nm photometrisch mittels eines BioTek Synergy 4 quantifiziert. Die Caspase-3-Aktivität unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt. Alle weiteren Messwerte wurden relativ hierzu angegeben.

3.11 Densitometrische Signalauswertung

Die Auswertung der Banden aus Western-Blot und Autoradiographie erfolgte densitometrisch unter Verwendung der Kodak 1D 3.5 Software. Im Western-Blot erhaltene Signale wurden auf den zugehörigen β -Aktin-Gehalt normalisiert.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels eines gepaarten t-Tests unter Verwendung der GraphPad Software. Für alle Berechnungen wurden mindestens drei Werte aus drei unabhängigen Messungen herangezogen. P-Werte $< 0,005$ (**) und $< 0,05$ (*) wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Anti-apoptotischer Effekt von TUDCA in TcsL-induzierter Apoptose

Die TcsL-induzierte Apoptose wurde in Makrophagen-ähnlichen J774A.1-Zellen anhand der Phosphatidylserinexternalisierung mittels AnnexinV-Färbung untersucht. Die Behandlung von J774A.1-Zellen mit TcsL für 12 h induzierte die Phosphatidylserinexternalisierung in etwa 25-30 % der Zellen (Abb. 1B). J774A.1-Zellen zeigten eine runde Morphologie, die sich auch nach TcsL Behandlung nicht ändert. TUDCA wurde auf eine mögliche anti-apoptotische Wirkung in der TcsL-induzierten Apoptose untersucht. TUDCA reduzierte die TcsL-induzierte Phosphatidylserinexternalisierung deutlich (Abb. 1A und 1B). TUDCA allein induzierte weder morphologische Änderungen noch Apoptose in J774A.1-Zellen (Abb. 1A und 1B). Letztere Beobachtung stand im Einklang mit seiner Klassifizierung als protektive (anti-apoptotische) Gallensäure (Amaral *et al.*, 2009).

Um den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA auf die TcsL-induzierte Apoptose näher zu untersuchen, wurden die Phosphatidylserinexternalisierung und die Abnahme der Viabilität (Aktivität zellulärer Dehydrogenasen) in Abhängigkeit steigender TcsL-Konzentration bestimmt. Apoptose in J774A.1-Zellen wurde ab einer TcsL-Konzentration von 10 bis 30 ng/ml beobachtet (Abb. 2). Ein Maximalwert von etwa 30 bis 35 % AnnexinV-positiven Zellen wurde bei einer TcsL-Konzentration von etwa 100 ng/ml erreicht. Eine weitere Erhöhung der Konzentration bis auf 1000 ng/ml steigerte die Externalisierung von Phosphatidylserin nicht maßgeblich (Abb. 2). Durch Vorinkubation der Zellen mit TUDCA ließ sich die TcsL-induzierte Apoptose deutlich reduzieren. Selbst bei einer hohen TcsL-Konzentration von 1000 ng/ml war TUDCA anti-apoptotisch wirksam und die Rate der AnnexinV-positiven Zellen blieb unter 10 %. Für weitere Versuche wurde eine TcsL-Konzentration von 100 ng/ml TcsL gewählt, da diese hinreichend war, einen maximalen Effekt auszulösen.

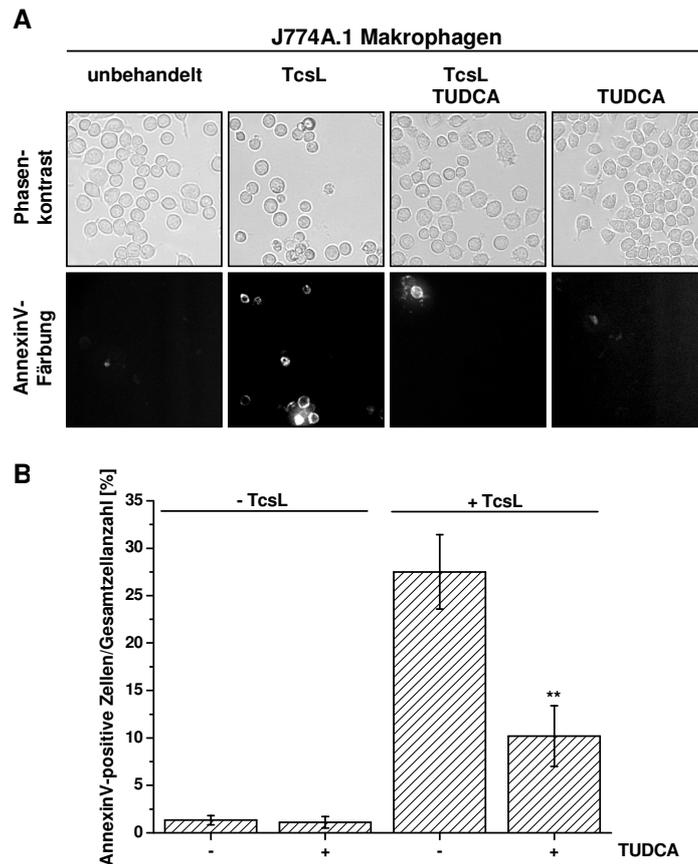


Abb. 1: Anti-apoptotischer Effekt von TUDCA auf die TcsL-induzierte Apoptose.

(A) J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. Die Phosphatidylserinexternalisierung wurde nach 12 h durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Abbildungen zeigen die AnnexinV-Färbung (unten) sowie die korrespondierenden Phasenkontrastbilder (oben). (B) Die TcsL-induzierte Apoptose wurde als Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellanzahl quantifiziert. Die gezeigten Resultate repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurden als statistisch signifikant angesehen.

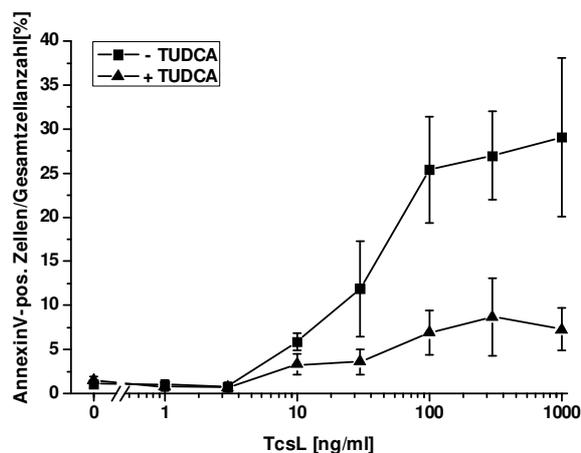


Abb.2: TUDCA reduziert die TcsL-induzierte Apoptose.

J774A.1-Zellen wurden mit TcsL in steigender Konzentration behandelt. Die Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) erfolgte für 1 h. Die TcsL-induzierte Apoptose wurde 12 h nach TcsL-Zusatz anhand der Phosphatidylserinexternalisierung als Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen zur Gesamtzellanzahl quantifiziert. Die Daten geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

Ergebnisse

Um die Befunde der Phosphatidylserinexternalisierung zu erhärten, wurde eine Messung der Viabilität mittels WST-1-Test in TcsL-behandelten Zellen durchgeführt. TcsL reduzierte konzentrationsabhängig die Viabilität in J774A.1-Zellen (Abb. 3). Eine Abnahme der Viabilität wurde bei TcsL-Konzentrationen ≥ 30 ng/ml beobachtet. Die Vorinkubation mit TUDCA führte auch hier zu einem deutlichen anti-apoptotischen Effekt. Bis zu einer Konzentration von 300 ng/ml TcsL schützte TUDCA vor der TcsL-induzierten Reduktion der Viabilität (Abb. 3). Erst bei einer TcsL-Konzentration von 1000 ng/ml tritt eine geringe Viabilitätsabnahme auf. TUDCA allein verursachte aber keine Steigerung der Viabilität von J774A.1-Zellen (Abb. 3). Somit korrelierten die Daten der Phosphatidylserinexternalisierung und des WST-1-Testes. TUDCA war in TcsL-behandelten Zellen anti-apoptotisch wirksam, wobei sich der anti-apoptotische Effekt von TUDCA über einen weiten TcsL-Konzentrationsbereich erstreckte und selbst durch erhöhte TcsL-Konzentrationen nicht aufgehoben wurde.

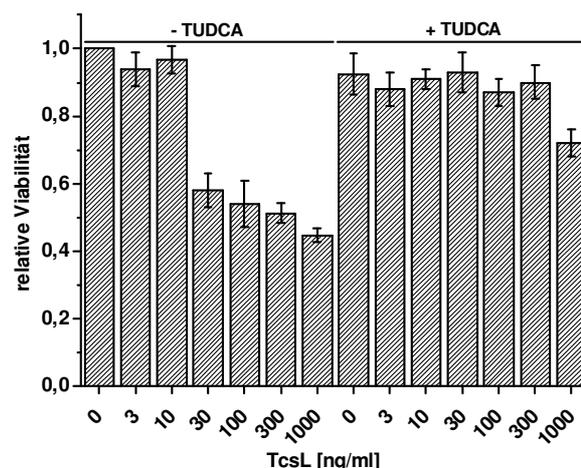


Abb. 3: TUDCA erhöht die Viabilität TcsL-behandelter Zellen.

J774A.1 Zellen wurden mit TcsL in steigender Konzentration versetzt. Die Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) erfolgte für 1 h. Die metabolische Aktivität zellulärer Dehydrogenasen wurde mittels WST-1-Test nach 24 h gemessen. Die Viabilität unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und die anderen Werte relativ hierzu angegeben. Die Daten geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

4.2 Identifikation der Ursache des anti-apoptotischen Effektes von TUDCA

Die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA kann entweder auf einer Aktivierung der Signalaktivität distal der glycosylierten TcsL-Substratproteine beruhen oder auf einer Hemmung der Toxinaktivität. Zunächst wurden mögliche TUDCA-Effekte auf die TcsL-Aktivität untersucht.

Ergebnisse

Um eine mögliche TUDCA-Wirkung auf die Glucosyltransferase-Aktivität von TcsL zu untersuchen, wurde die Glucosylierung der Substratproteine H-Ras und Rac1 im zellfreien System durchgeführt. Sowohl H-Ras als auch Rac1 wurden durch TcsL konzentrationsabhängig glucosyliert (Abb. 4A und 4B). Die Glucosylierung von Rac1 durch TcsL erfolgte jedoch im Vergleich zu H-Ras mit geringerer Effizienz (Abb. 4A und 4B). H-Ras konnte somit als primäres Substrat von TcsL angesehen werden. In der Anwesenheit von TUDCA folgte die Glucosylierung sowohl von H-Ras als auch Rac1 durch TcsL einer nahezu identischen Kinetik (Abb. 4B). Die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA beruht somit vermutlich nicht auf einer Hemmung der Glucosyltransferaseaktivität von TcsL.

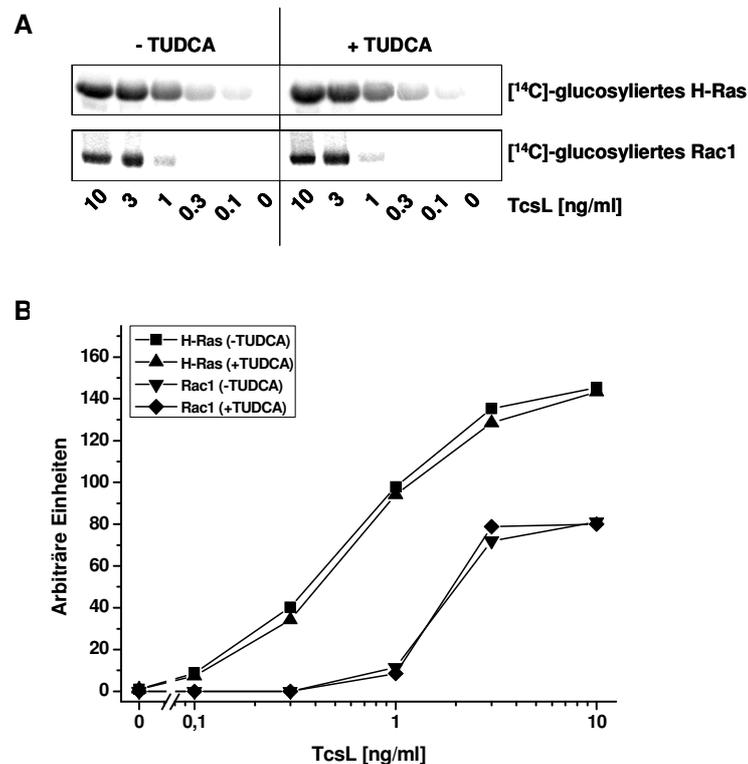


Abb. 4: Die TcsL-induzierte Glucosylierung von H-Ras und Rac1 ist von TUDCA unabhängig. (A) TcsL wurde in absteigender Konzentration in Gegenwart von rekombinantem H-Ras oder Rac1 und [¹⁴C]-Glucose für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend denaturiert und im SDS-Gel getrennt. Die Glucosylierung von Rac1 wurde nachfolgend mittels Autoradiographie untersucht. (B) Für eine Aufnahme der Kinetik wurden die Banden durch die Kodak 1D 3.5 Network Software quantifiziert.

Ergebnisse

Anschließend wurde untersucht, ob TUDCA die Glucosylierung von Rac1 und Ras in TcsL-behandelten Zellen beeinflusst. Die Glucosylierung von Rac1 kann unter Verwendung des glucosylierungssensitiven Rac1(Mab102)-Antikörpers im Westernblot nachgewiesen werden. Der Rac1(Mab102)-Antikörper detektiert ausschließlich nicht-glucosyliertes Rac1 (Genth *et al.*, 2006). Der Rac1(Mab23A8)-Antikörper bindet dagegen unabhängig von der Glucosylierung und kann daher als Marker für den totalen Rac1-Spiegel angesehen werden (Genth *et al.*, 2006). TcsL glucosylierte konzentrationsabhängig Rac1, wie die (scheinbare) Abnahme des Rac1-Spiegels bei Verwendung des Rac1(Mab102)-Antikörpers in der Westernblot-Analyse anzeigt (Abb. 5A). Die (scheinbare) Abnahme des Rac1-Spiegels beruhte auf Glucosylierung (und nicht auf Degradation), da der Rac1-Spiegel (tatsächlich analysiert durch Rac1(Mab23A8)) konstant war (Abb. 5A). Der konstante β -Aktin-Spiegel zeigte eine gleichmäßige Gelbeladung an. In Anwesenheit von TUDCA erfolgte ebenfalls eine vollständige Rac1-Glucosylierung durch TcsL. TUDCA allein induzierte keine Änderung der Rac1-Detektion weder bei Verwendung des Rac1(Mab102)- noch des Rac1(Mab23A8)-Antikörpers (Abb. 5A).

Vergleichbar der Detektion der Rac1-Glucosylierung durch den Rac1(Mab102)-Antikörper existiert mit dem Ras(Mab 27H5) ein Antikörper, der H/K/N-Ras glucosylierungssensitiv detektiert (Huelsenbeck *et al.*, 2009). Der K-Ras (Mab F234)-Antikörper (vergleichbar dem Rac1(Mab23A8)-Antikörper) detektiert K-Ras hingegen unabhängig von der Glucosylierung. TcsL führte ebenfalls zu einer (nahezu) vollständigen Abnahme von H/K/N-Ras im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei Verwendung des Antikörpers Ras (Mab 27H5) (Abb. 5B). Eine Degradation konnte auch hier ausgeschlossen werden, da keine Abnahme des K-Ras-Spiegels bei Verwendung des Antikörpers F234 auftrat (Abb. 5B). Somit beruhte die scheinbare Abnahme auch hier auf der Glucosylierung durch TcsL. Der Spiegel von K-Ras stieg durch die Einwirkung von TcsL sogar leicht an (Abb. 5B). Trotz des erhöhten K-Ras-Spiegels waren H/K/N-Ras in TcsL-behandelten Zellen aber vollständig glucosyliert. Die Glucosylierung von H/K/N-Ras durch TcsL erfolgte unabhängig von der Anwesenheit von TUDCA (Abb. 5B). TUDCA allein induzierte keine Abnahme des Ras-Spiegels.

Ergebnisse

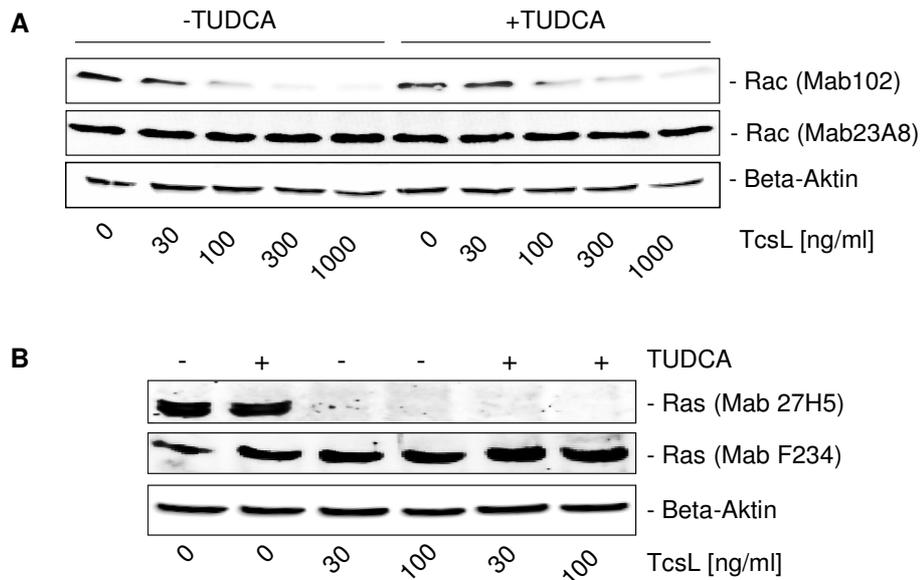


Abb. 5: TUDCA beeinflusst die Glucosyltransferaseaktivität clostridialer glucosylierender Toxine auf zellularer Ebene nicht.

J774A.1-Zellen wurden nach Vorbehandlung mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcsL (100 ng/ml) versetzt. Nach 12 h wurde ein Western-Blot durchgeführt, um die Konzentrationen von Rac1 (A) und Ras (B) zu bestimmen.

Neben der Hemmung der TcsL-Glucosyltransferaseaktivität könnte TUDCA die rezeptorvermittelte Aufnahme des TcsL in die Zielzelle blockieren, z.B. durch Konkurrenz am (bisher nicht identifizierten) Toxinrezeptor. Dies wurde untersucht, indem der Zeitpunkt des TUDCA-Zusatzes relativ zur TcsL-Behandlung variiert wurde. TUDCA war mit vergleichbarer Effizienz anti-apoptotisch wirksam, unabhängig davon, ob TUDCA 1 h vorinkubiert wurde, zeitgleich mit TcsL appliziert wurde oder 1 h nach TcsL-Zusatz hinzugefügt wurde (Abb. 6). Selbst bei Applikation von TUDCA 2 h nach TcsL-Zusatz bestand ein mäßiger anti-apoptotischer Effekt (Abb. 6). Wurde TUDCA dagegen 4 h nach dem TcsL-Zusatz appliziert, trat keine anti-apoptotische Wirkung mehr ein (Abb. 6). Diese Daten schließen aus, dass der anti-apoptotische Effekt von TUDCA auf einer Konkurrenz der TcsL-Aufnahme am Toxinrezeptor beruht. Die Ergebnisse (Abb. 4-6) legen nahe, dass TUDCA weder die TcsL-Aufnahme in die Zielzelle noch die TcsL-Glucosyltransferaseaktivität hemmt. Der anti-apoptotische Effekt von TUDCA beruht somit höchstwahrscheinlich nicht auf einer Hemmung der TcsL-Aktivität.

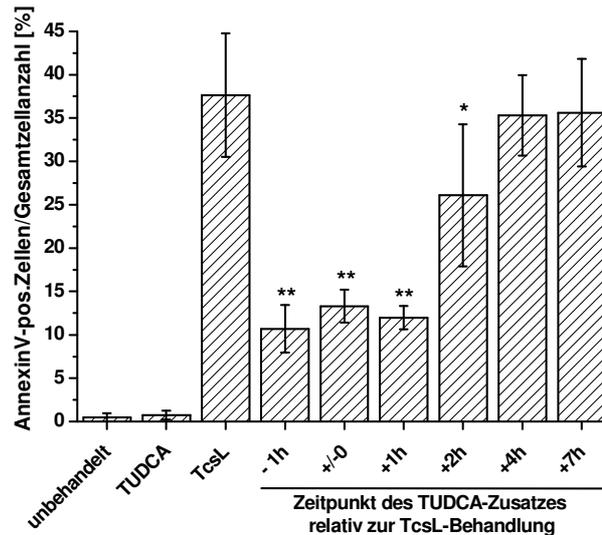


Abb. 6: TUDCA ist bei Applikation nach TcsL-Zusatz anti-apoptotisch wirksam.

Der Zeitpunkt des TUDCA-Zusatzes (300 μ M) wurde relativ zu der Behandlung mit TcsL (100 ng/ml) variiert und die Phosphatidylserinexternalisierung 16 h nach TcsL-Zusatz mittels AnnexinV-Färbung bestimmt. Die Daten geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder. P-Werte < 0,005 (**) und < 0,05 (*) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurden als statistisch signifikant angesehen.

Anschließend wurde untersucht, ob TUDCA die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges distal der H/K/N-Ras-Glucosylierung erhält. Ist dies der Fall, sollte der anti-apoptotische Effekt von TUDCA durch Inhibitoren der PI3K und/oder des PI3K-Effektors Akt hemmbar sein. Dieses Experiment setzt voraus, dass weder der PI3K-Inhibitor LY294002 noch der Akt-Inhibitor selbst Apoptose induzieren. Daher wurde untersucht, ab welcher Konzentration LY294002 bzw. der Akt-Inhibitor Apoptose in J774A.1-Zellen induziert. Dazu wurde die Phosphatidylserin-externalisierung und die Viabilität in Abhängigkeit steigender Konzentration des PI3K-Inhibitors LY294002 und des Akt-Inhibitors untersucht. LY294002 führte bei einer Konzentration von 100 μ M in etwa 35 % der J774A.1-Zellen zur Externalisierung von Phosphatidylserin (Abb. 7). Auch die Viabilität wurde durch LY294002 reduziert (Abb.8). Bei einer Konzentration von 30 μ M trat eine mäßige Viabilitätsabnahme ein. Durch Erhöhung der Konzentration wurde die Viabilität deutlich reduziert. Die Viabilität betrug bei einer Konzentration von 100 μ M LY294002 etwa 40 % des Wertes von unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 8). Bei einer Konzentration von 300 μ M war nur noch eine geringe Restviabilität vorhanden. Dies zeigte, dass die Einleitung von Apoptose durch direkte Hemmung der PI3K möglich ist. Bei Konzentrationen des PI3K-Inhibitors ≤ 10 μ M trat dagegen keine Abnahme der Viabilität ein (Abb. 8) und auch der Anstieg der AnnexinV-positiven Zellen war vernachlässigbar klein (Abb. 7).

Ergebnisse

Die Verwendung des Akt-Inhibitors führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Bei einer Konzentration von 100 μM trat sowohl eine starke Abnahme der Viabilität (Abb. 8) als auch eine starke Zunahme der AnnexinV-positiven Zellen auf einen Wert von etwa 30 % ein (Abb. 7). Daher ist eine Einleitung der Apoptose auch durch eine direkte Hemmung des PI3K-Effektors Akt möglich. Auch der Akt-Inhibitor zeigte bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ weder eine Zunahme an AnnexinV-positiven Zellen (Abb. 7) noch eine Abnahme der Viabilität (Abb. 8). Zur Untersuchung der Funktion des PI3K/Akt-Signalweges im anti-apoptischen Effekt von TUDCA wurden sowohl LY294002 als auch der Akt-Inhibitor in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, da dieses die maximale Konzentration darstellte, bei der beide Inhibitoren keine Apoptose induzierten.

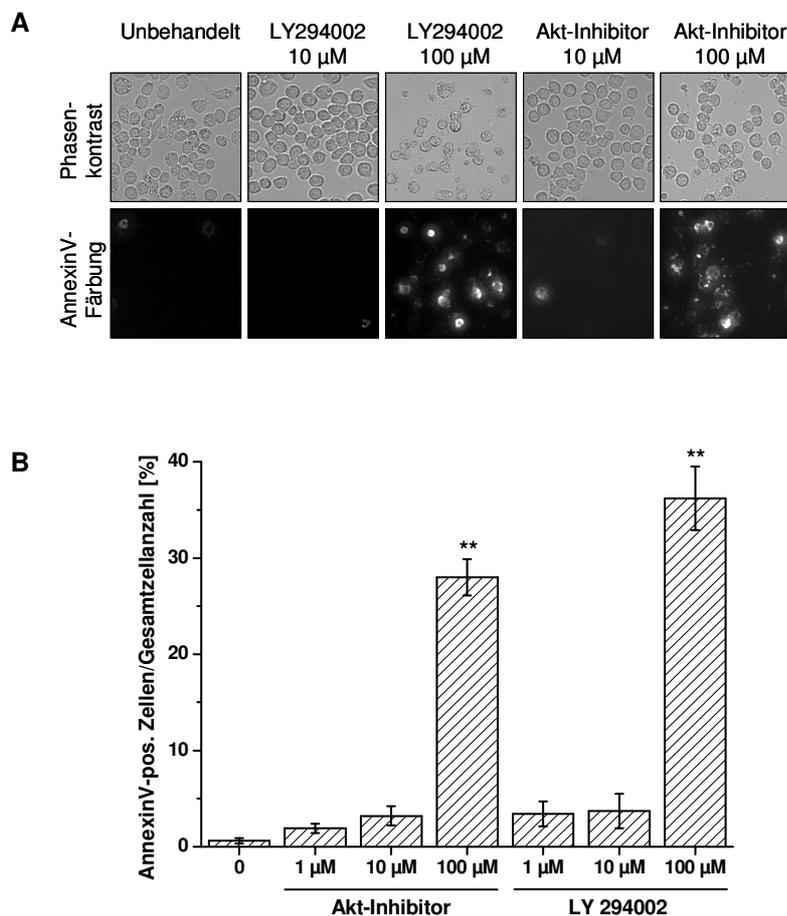


Abb. 7: Die Hemmung des PI3K-/Akt-Signalweges führt zur Einleitung von Apoptose

(A) J774A.1-Zellen wurden mit LY294002 oder dem Akt-inhibitor in steigender Konzentration behandelt. Nach Inkubation für 18 h wurde die Phosphatidylserinexternalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die untere Reihe zeigt die AnnexinV-Färbung, die obere Reihe die korrespondierenden Phasenkontrastbilder. (B) Das Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellanzahl wurde quantifiziert. Die gezeigten Resultate repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert $< 0,005$ (**) im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurden als statistisch signifikant angesehen.

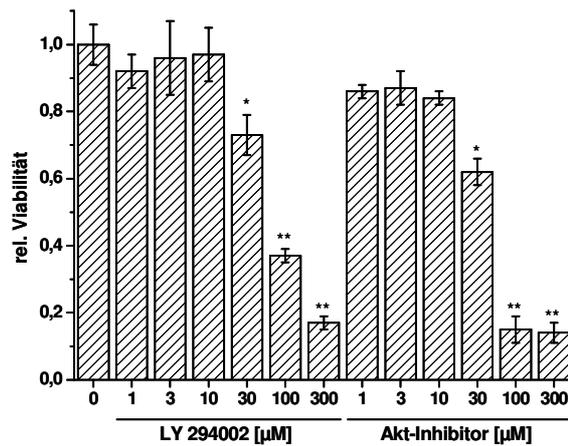


Abb. 8: Die Hemmung des PI3K-/Akt-Signalweges reduziert die Viabilität

J774A.1-Zellen wurden mit LY294002 oder dem Akt-Inhibitor in steigender Konzentration behandelt. Nach Inkubation für 24 h wurde eine Viabilitätsbestimmung mittels WST-1-Test durchgeführt. Die Daten geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen wieder. P-Werte < 0,005 (**) und < 0,05 (*) im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurden als statistisch signifikant angesehen.

Um nun zu untersuchen, ob der anti-apoptotische Effekt von TUDCA auf einer Erhaltung der Aktivität des PI3K-Akt-Signalweges in TcsL-behandelten Zellen beruht, wurden J774A.1-Zellen mit TUDCA sowie dem PI3K-Inhibitor LY294002 oder dem Akt-Inhibitor ko-inkubiert. Die zusätzliche Behandlung mit LY294002 hob den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA nahezu vollständig auf (Abb. 9A und 9B). Das Verhältnis der AnnexinV-positiven Zellen zur Gesamtzellanzahl war mit ausschließlich TcsL-behandelten Zellen vergleichbar (Abb. 9B). Auch die Hemmung des PI3K-Effektors Akt unterdrückte die anti-apoptische Wirkung von TUDCA nahezu vollständig (Abb. 9A und 9B). Weder LY294002 noch der Akt-Inhibitor verstärkten aber die TcsL-induzierte Apoptose (Abb. 9A und 9B). Auch im WST1-Test wurde die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA durch LY294002 und den Akt-Inhibitor ebenfalls vollständig aufgehoben (Abb. 10). Auch die Abnahme der Viabilität war hier mit ausschließlich TcsL-behandelten Zellen vergleichbar. Beide Inhibitoren führten aber allein weder zu einer maßgeblichen Abnahme der Viabilität noch verstärkten sie die TcsL-induzierte Viabilitätsabnahme (Abb. 10). Diese Beobachtungen legten eine kritische Funktion des PI3K/Akt-Signalweges im anti-apoptotischen Effekt von TUDCA nahe.

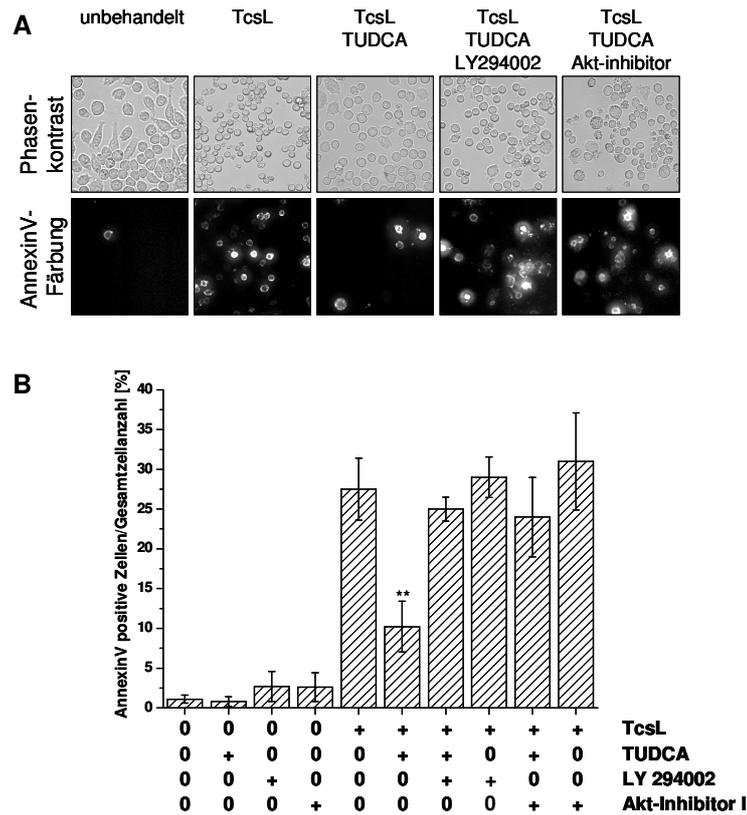


Abb. 9: LY294002 und der Akt-Inhibitor heben den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA auf.

(A) J774A.1-Zellen wurden mit LY294002 (10 µM) oder dem Akt-inhibitor (10 µM) 1 h nach Zusatz von TUDCA (300 µM) behandelt. Nach Inkubation für 1h wurde TcsL (100 ng/ml) hinzugefügt und die Phosphatidylserinexternalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 12 h untersucht. Die untere Reihe zeigt die AnnexinV-Färbung, die obere Reihe die korrespondierenden Phasenkontrastbilder. (B) Die Graphik zeigt die Quantifizierung der AnnexinV-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellanzahl und repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

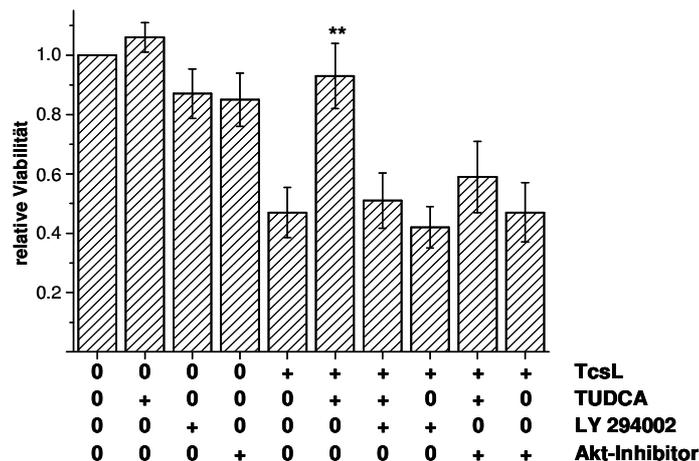


Abb.10: LY294002 und der Akt-Inhibitor heben den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA auf.

J774A.1-Zellen wurden mit LY294002 (10 µM) oder dem Akt-inhibitor (10 µM) 1 h nach Zusatz von TUDCA (300µM) behandelt. Nach Inkubation für 1h wurde TcsL (100 ng/ml) hinzugefügt und die Viabilität mittels WST1-Test nach 24 h bestimmt. Die Viabilität unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und die anderen Werte relativ hierzu angegeben. Die Daten geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Um die kritische Rolle des PI3K/Akt-Signalweges im anti-apoptotischen Effekt von TUDCA weiter abzusichern, wurde der Einfluß von LY294002 sowie des Akt-Inhibitors auf die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA im Hinblick auf die TcsL-induzierte Aktivierung der Caspase-3 untersucht. TcsL führte zu einer starken Aktivierung der Caspase-3 (Abb. 11). Der Wert war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen etwa um den Faktor 12 erhöht. TUDCA wies auch hier einen deutlichen anti-apoptotischen Effekt auf und reduzierte die Aktivierung der Caspase-3 in TcsL-behandelten Zellen auf etwa den Faktor 4 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 11). Die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA wurde durch den PI3K-Inhibitor LY294002 und partiell durch den Akt-Inhibitor wieder aufgehoben (Abb. 11). LY294002 und der Akt-Inhibitor allein (in der Konzentration von 10 µM) induzierten keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 11). Auch die TcsL-induzierte Caspase-3-Aktivierung wurde durch die Inhibitoren (wenn überhaupt) nur geringfügig verstärkt (Abb. 11). Diese Beobachtungen sind mit den Daten der Phosphatidylserinexternalisierung und der Viabilitätsbestimmung vergleichbar. Sowohl der PI3K-Inhibitor LY294002 als auch der Akt-Inhibitor konnten also den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA in der TcsL-induzierten Apoptose aufheben (Abb. 9 bis 11). Dieses zeigt, dass der PI3K/Akt-Signalweg für die TcsL-induzierte Apoptose kritisch ist bzw. die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA maßgeblich auf einer Aktivierung der PI3K beruht.

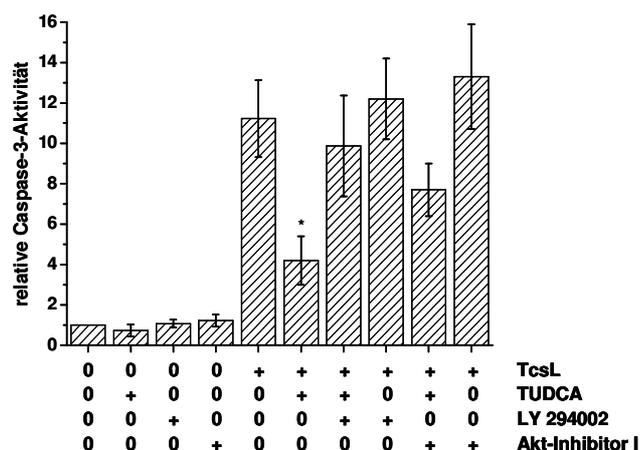


Abb.11: Kritische Funktion des PI3K/Akt-Signalweges in TcsL-induzierter Caspase-3-Aktivierung.

J774A.1-Zellen wurden mit LY294002 (10 µM) oder dem Akt-inhibitor (10 µM) nach Vorinkubation mit TUDCA (300 µM) für 1 h behandelt. TcsL (100 ng/ml) wurde hinzugefügt und die Zellen für 6 h inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die Aktivität der Caspase-3 colorimetrisch bestimmt. Die Caspase-3-Aktivität unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und die anderen Werte relativ hierzu angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ein P-Wert < 0,05 (*) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.3 TUDCA induziert die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Um zu überprüfen, ob TUDCA tatsächlich zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges führt, wurde der Spiegel von phosphoryliertem (aktivem) Akt untersucht. TUDCA induzierte eine deutliche Erhöhung des Spiegels von phospho-Akt im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 12A und 12B). LY294002 reduzierte den phospho-Akt-Spiegel sowohl in TUDCA-behandelten Zellen als auch in unbehandelten Zellen (Abb. 12A und 12B). Sowohl die TUDCA-induzierte als auch die residuale Akt-Phosphorylierung war somit von der PI3K abhängig.

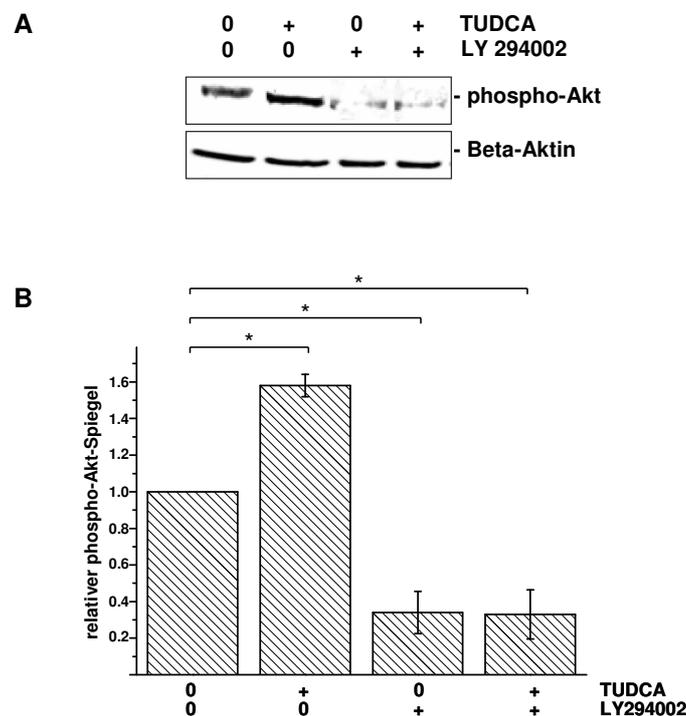


Abb. 12: TUDCA führt PI3K-abhängig zu einer Phosphorylierung von Akt.

(A) J774A.1-Zellen wurden mit TUDCA (300 μ M) und/oder LY294002 (10 μ M) für 6 h behandelt. Die Phosphorylierung von Akt wurde mittels Western-Blot untersucht. 30 min vor der Lyse der Zellen wurde Natriumorthovanadat (1 mM) als Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt. Gezeigt sind die Spiegel von phosphoryliertem (aktivem) Akt und β -Aktin. (B) Die phospho-Akt-Signale wurden densitometrisch durch die Kodak 1D 3.5 Network Software quantifiziert. Der Wert unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und alle weiteren Messwerte relativ hierzu angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ein P-Wert < 0,05 (*) im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

Im Folgenden wurde untersucht, ob TUDCA auch in TcsL-behandelten Zellen eine Erhaltung der Akt-Phosphorylierung vermittelt. Die TcsL-Behandlung induzierte eine Abnahme des phospho-Akt-Spiegels (Abb. 13 A und 13B). Dieses bestätigte, dass die TcsL-induzierte Ras-Glucosylierung den PI3K/Akt-Signalweg hemmt. Bei Vorbehandlung mit TUDCA blieb der phospho-Akt-Spiegel dagegen erhalten.

Ergebnisse

LY294002 hob die Aktivierung von PI3K/Akt durch TUDCA auf (Abb. 13 A und 13B). TUDCA bewirkt somit in unbehandelten Zellen eine (moderate) Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und in TcsL-behandelten Zellen eine Erhaltung der Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges.

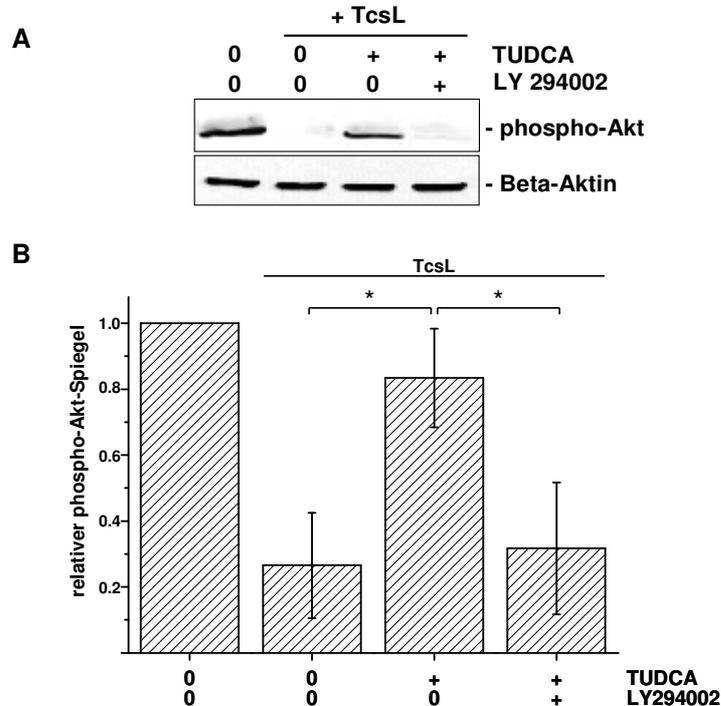


Abb. 13: TUDCA aktiviert PI3K-abhängig Akt in TcsL-behandelten Zellen.

(A) J774A.1-Zellen wurden mit TUDCA (300 μ M) und/oder LY294002 (10 μ M) für 6 h behandelt. Die Phosphorylierung von Akt wurde mittels Western-Blot untersucht. 30 min vor der Lyse der Zellen wurde Natriumorthovanadat (1 mM) als Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt. Gezeigt sind die Spiegel von phosphoryliertem (aktivem) Akt und β -Aktin. (B) Die phospho-Akt-Signale wurden densitometrisch durch die Kodak 1D 3.5 Network Software quantifiziert. Der Wert unbehandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und alle weiteren Messwerte relativ hierzu angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ein P-Wert < 0,05 (*) im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.4 Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges durch TUDCA reduziert die TcsL-induzierte Expression von pro-apoptischem RhoB

RhoB ist ein pro-apoptisches Protein, dessen Expression durch H/K/N-Ras PI3K/Akt-abhängig unterdrückt wird (Jiang *et al.*, 2004). Die Ras-Glucosylierung durch TcsL sollte diese RhoB-Suppression aufheben und eine RhoB-Expression induzieren. Der Spiegel von RhoB war in unbehandelten J774A.1-Zellen gering (Abb. 14). TcsL induzierte eine starke RhoB-Expression. TUDCA führte zu einer deutlichen Suppression der TcsL-induzierten RhoB-Expression (Abb. 14B und 14C). Diese war PI3K-abhängig, da bei zusätzlicher Behandlung mit LY294002 erneut eine verstärkte RhoB-Expression auftrat (Abb. 14B und 14C). Der Inhibitor allein führte

Ergebnisse

aber nicht zu einem verstärkten RhoB-Signal (Abb. 14A). Diese Beobachtungen zeigen, dass TUDCA durch Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges die TcsL-induzierte RhoB-Expression unterdrückt.

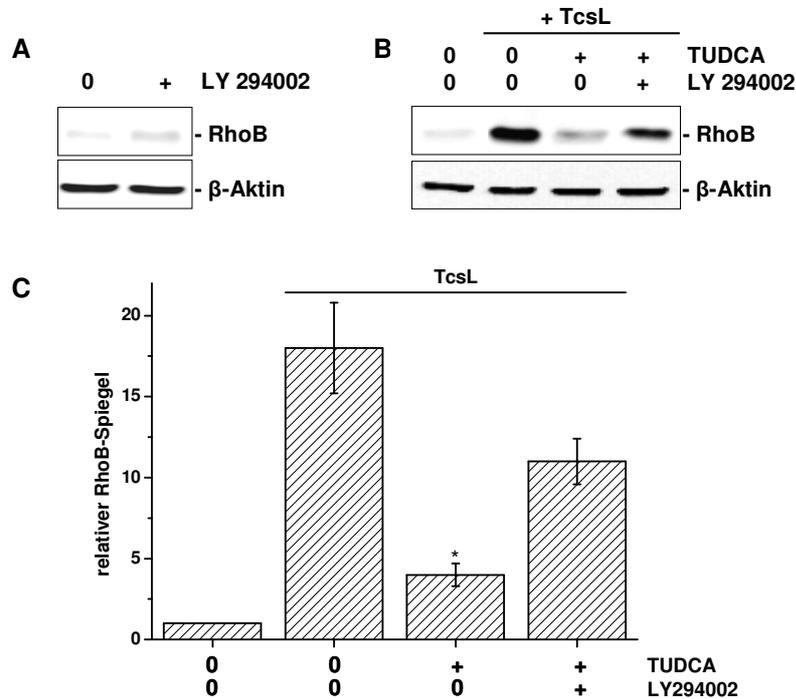


Abb. 14: Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges reduziert die TcsL-induzierte RhoB-Expression.

(A) J774A.1-Zellen wurden für 7h mit LY294002 (10 μ M) behandelt. (B) J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit LY294002 (10 μ M) behandelt. Nach 1 h wurde TcsL in den angezeigten Konzentrationen hinzugefügt und die Zellen für weitere 6 h inkubiert. Nach der Zellyse wurde ein Western-Blot gegen RhoB durchgeführt. (C) Die RhoB-Signale wurden densitometrisch durch die Kodak 1D 3.5 Network Software quantifiziert. Der Wert un behandelter Zellen wurde 1,0 gesetzt und alle weiteren Messwerte relativ hierzu angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ein P-Wert < 0,05 (*) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurden als statistisch signifikant angesehen.

4.5 Keine Hemmung der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose durch TUDCA

TcdA und TcdB aus *Clostridium difficile* weisen bezüglich Struktur und Funktion eine große Ähnlichkeit zu TcsL aus *Clostridium sordellii* auf (Just & Gerhard, 2004; Busch & Aktories, 2000; Von Eichel-Schreiber *et al.*, 1996). Die Toxine unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität. Im Gegensatz zu TcsL glucosylieren TcdA und TcdB ausschließlich GTP-bindende Proteine der Rho-Familie, nicht aber Ras-Proteine (Halabi-Cabazon *et al.*, 2008; Boquet & Lemichez, 2003; Just *et al.*, 1995a,b). Im Folgenden wurde untersucht, ob TUDCA auch in TcdA- oder TcdB-behandelten anti-apoptotisch wirksam ist. TcdA und TcdB führten zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin in J774A.1-Zellen (Abb. 15A und 15B). TcdB induzierte in etwa 25-30 % der J774A.1-Zellen Apoptose, während TcdA in ca. 20 %

Ergebnisse

der Zellen die Externalisierung von Phosphatidylserin einleitete (Abb. 15 B). TUDCA war weder in TcdA- noch in TcdB-behandelten Zellen anti-apoptotisch wirksam (Abb. 15A und 15B).

Diese Beobachtungen bestätigten sich im WST-1-Test. Sowohl TcdA als auch TcdB führten unabhängig von der Anwesenheit von TUDCA zu einer vergleichbaren Abnahme der Viabilität (Abb. 16). Somit zeigte TUDCA keinen anti-apoptotischen Effekt in der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose. Die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA war somit spezifisch für die TcsL-induzierte Apoptose, die auf Hemmung Ras-abhängiger Signalwege beruht. TUDCA wirkte offenbar nicht auf Rho-abhängige Signalwege, deren Hemmung auch Apoptose induzierte. Zudem bestätigten diese Beobachtungen mit den verwandten Toxinen TcdA und TcdB obige Schlußfolgerung, dass TUDCA nicht über eine Hemmung der Toxin-Aufnahme in die Zielzelle wirkt.

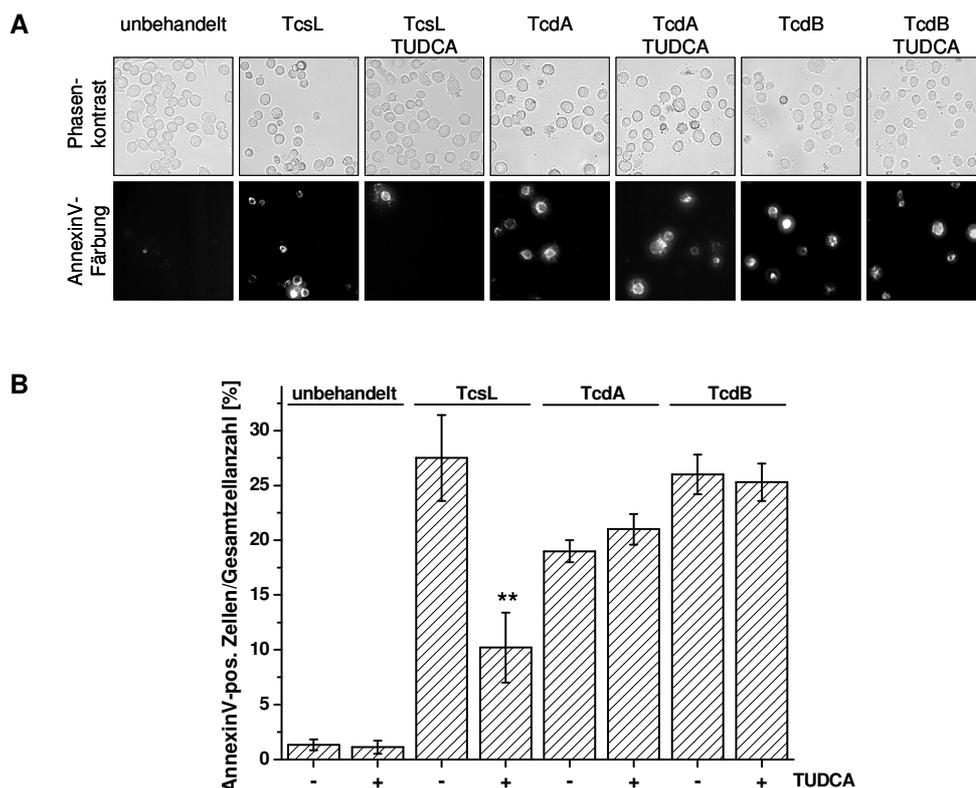


Abb. 15: Kein anti-apoptotischer Effekt von TUDCA in TcdA- und TcdB-induzierter Apoptose.

(A) J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcdA, TcdB oder TcsL (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Die Phosphatidylserinexternalisierung wurde nach 12 h durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Abbildung zeigt die AnnexinV-Färbung (unten) sowie die korrespondierenden Phasenkontrastbilder (oben). (B) Das Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellanzahl wurde quantifiziert. Die gezeigten Resultate repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen

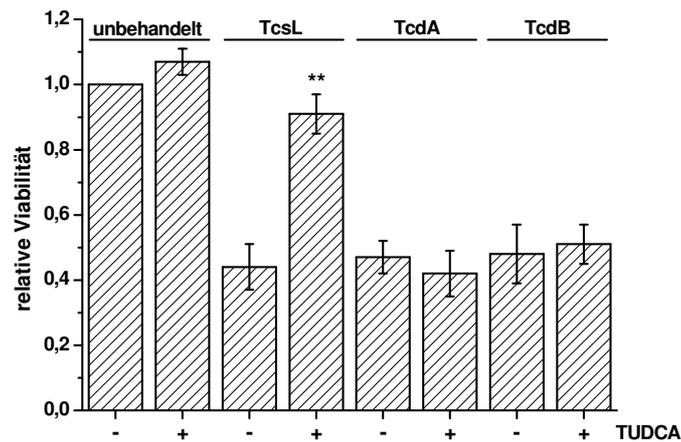


Abb. 16: TUDCA erhöht die Viabilität TcsL-behandelter Zellen, aber nicht von TcdA- oder TcdB-behandelten Zellen.

J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcdA, TcdB und TcsL (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Die metabolische Aktivität zellulärer Dehydrogenasen wurde mittels WST-1-Test nach 24 h gemessen. Die Daten wurden auf den Wert für unbehandelte Kontrollzellen normalisiert und geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder. Ein P-Wert < 0,005 (*) im Vergleich zu ausschließlich Toxin-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.6 Keine Hemmung der Glucosyltransferaseaktivität von TcdA und TcdB auf zellularer Ebene durch TUDCA

Im Folgenden wurde untersucht, ob TUDCA einen Einfluss auf die Glucosylierung von Substratproteinen in TcdA/TcdB-behandelten J774A.1-Zellen besitzt. Rac1 war in TcdA/TcdB-behandelten Zellen vollständig glucosyliert, wie mittels des glucosylierungssensitiven Rac1(Mab102)-Antikörpers gezeigt (Abb. 17). Diese Abnahme war auf Glucosylierung -und nicht auf Degradation- zurückzuführen, da der Rac1-Spiegel bei Verwendung des Rac1(Mab23A8)-Antikörpers nicht abnahm sondern konstant blieb (Abb. 17). Bei zusätzlicher Behandlung mit TUDCA war Rac1 ebenfalls vollständig glucosyliert (Abb. 17). Diese Beobachtung schließt eine hemmende Wirkung von TUDCA auf die Aktivität von TcdA/TcdB aus. In TcdA/TcdB-behandelten Zellen war der RhoA-Spiegel verglichen mit unbehandelten Zellen deutlich reduziert. Diese RhoA-Abnahme beruht vermutlich auf Degradation des glucosylierten RhoA (Genth *et al.*, 2006). Die RhoA-Degradation war offenbar unbeeinflusst von TUDCA (Abb. 17). Erwartungsgemäß glucosylierten TcdA/TcdB H/K/N-Ras nicht, da keine (scheinbare) Abnahme des H/K/N-Ras-Spiegels (bei Verwendung des glucosylierungssensitiven Ras(Mab 27H5)-Antikörpers) auftrat (Abb. 17). Interessanterweise nahm der K-Ras-Spiegel in TcdA-/TcdB-behandelten

Ergebnisse

J774A.1-Zellen sogar moderat zu (Abb. 17). In TcsL-behandelten Zellen waren erwartungsgemäß H/K/N-Ras vollständig und Rac1 fast vollständig (unabhängig von der Anwesenheit von TUDCA) glucosyliert (Abb. 17). Diese Beobachtungen zeigten, dass TUDCA keinen Einfluss auf die Glucosylierung von Substratproteinen in TcdA/TcdB/TcsL-behandelten Zellen besaß.

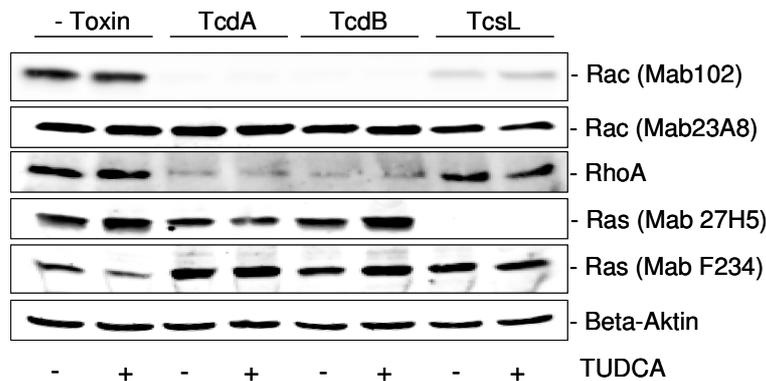


Abb. 17: Keine Hemmung der TcdA- und TcdB-induzierten Glucosylierung von Rac1 und RhoA.

J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1h mit TcdA, TcdB und TcsL (jeweils 100 ng/ml) versetzt. Nach 12 h wurde ein Western-Blot durchgeführt, um die Konzentrationen von Rac1, Ras, RhoA und β -Actin zu bestimmen.

4.7 Rolle der p38 MAPK in TcdA - und TcsL-induzierter Apoptose

Zellen reagieren auf die Hemmung kritischer Signalwege (z.B. Rho/Ras-abhängiger Signalwege), die das Zellüberleben sichern, mit einer Aktivierung der p38 MAPK (Lee *et al.*, 2009; Geny *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2007). Daher wurde untersucht, ob in TcdA- und TcsL-behandelten J774A.1-Zellen die p38 MAPK aktiviert ist. Die p38 MAPK-Aktivität lässt sich durch Verwendung des phospho-sensitiven Antikörpers phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10) im Western-Blot nachweisen. Der Antikörper p38 MAPK (A12) erkennt die p38 MAPK dagegen unabhängig von der Phosphorylierung. Serum stimuliert die Aktivität der p38 MAPK, was die Detektion einer zusätzlichen p38 MAPK-Aktivierung durch die Toxine erschwerte. Um die Toxin-induzierte p38 MAPK-Aktivierung zu bestimmen, wurden J774A.1 Zellen daher in Serum-freiem Medium kultiviert. In diesen Zellen war der Spiegel an phospho-p38 MAPK, d.h an aktiver p38 MAPK, niedrig (Abb. 18). Sowohl TcdA als auch TcsL induzierten eine verstärkte p38 MAPK-Phosphorylierung (Abb. 18). Somit war die p38 MAPK sowohl in TcdA- als auch in TcsL-behandelten Zellen aktiv. Die TcdA- und die TcsL-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK wurde durch den

Ergebnisse

p38 MAPK-Inhibitor SB203580 gehemmt (Abb. 18). Daher verhinderte SB203580 die Aktivierung der p38 MAPK in TcdA- und TcsL-behandelten Zellen. Der Gesamtspiegel der p38 MAPK blieb dagegen unabhängig vom Einsatz der Toxine oder SB203580 konstant (Abb. 18).

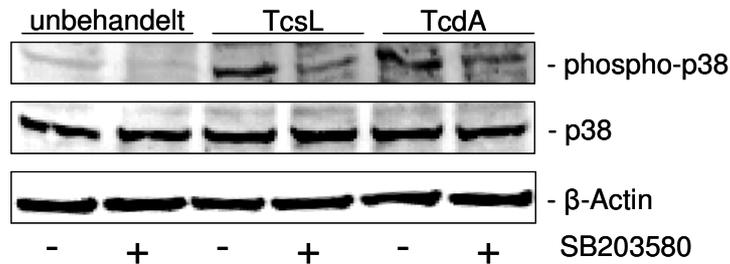


Abb. 18: SB203580 hemmt die TcdA- und TcsL-induzierte Aktivierung der p38 MAPK.

Serum-gehungerte J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit SB203580 (10 μ M) für 1 h TcdA und TcsL (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Nach 2h wurden die Zellen lysiert und die Spiegel von phosphorylierter und totaler p38 MAPK im Western-Blot analysiert. Natriumorthovanadat (1 mM) wurde als Phosphataseinhibitor zugesetzt.

In TcdA-behandelten Colonozyten besitzt die p38 MAPK eine pro-apoptotische Wirkung (Kim *et al.*, 2005b). Möglicherweise besitzt die p38 MAPK auch in TcdA-behandelten J774A.1-Zellen eine pro-apoptotische Funktion. Dies war in der Tat der Fall, da die TcdA-induzierte Phosphatidylserinexternalisierung durch den p38 MAPK-Inhibitor deutlich verringert wurde (Abb. 19A und 19B). Auch die TcsL-induzierte Apoptose wurde durch SB203580 deutlich reduziert (Abb. 19A und 19B). Der p38-MAPK Inhibitor allein führte zu keiner erhöhten Externalisierung von Phosphatidylserin (Abb 19A und 19B). Um die Befunde der Phosphatidylserinexternalisierung zu bestätigen, wurde ebenfalls eine Messung der Viabilität durchgeführt. SB203580 schützte ebenfalls sowohl vor der TcdA- als auch vor der TcsL-induzierten Viabilitätsabnahme (Abb. 20). SB203580 selbst induzierte keine Abnahme der Viabilität (Abb. 20). Diese Beobachtungen zeigten, dass sowohl die TcdA- als auch in TcsL-induzierte Apoptose in J774A.1-Zellen von der p38 MAPK abhängt. Die p38 MAPK besaß in diesem System somit eine pro-apoptotische Wirkung.

Ergebnisse

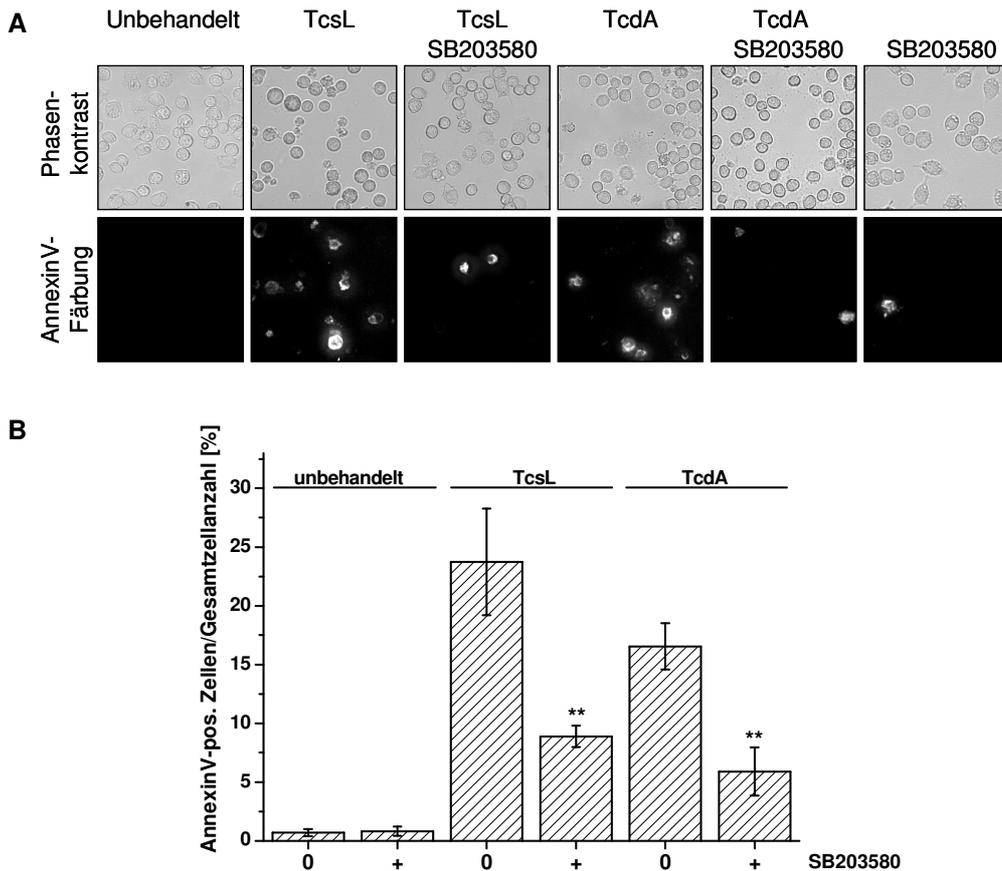


Abb. 19: SB203580 reduziert die TcdA- und TcsL-induzierte Apoptose.

(A) J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit SB203580 (10 μ M) für 1 h mit TcdA sowie TcsL (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Die Externalisierung von Phosphatidylserin wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 12 h untersucht. Die untere Reihe zeigt die AnnexinV-Färbung, die obere Reihe die korrespondierenden Phasenkontrastbilder. (B) Die Graphik zeigt die Quantifizierung des Verhältnisses von AnnexinV-positiven Zellen zur Gesamtzellanzahl und repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen. Ein P-Wert < 0,005 (*) im Vergleich zu ausschließlich Toxin-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

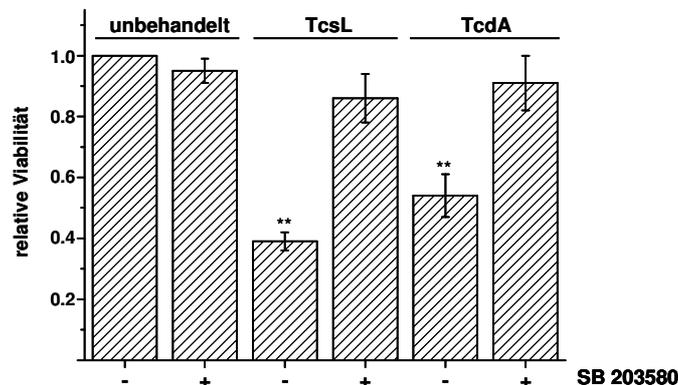


Abb. 20: Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges erhöht die Viabilität TcsL-behandelter Zellen.

J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit SB203580 (10 μ M) mit TcdA und TcsL (jeweils 100 ng/ml) behandelt. Die Viabilität wurde nach 24 h mittels WST1-Test bestimmt. Die Viabilität unbehaunderter Zellen wurde 1,0 gesetzt und alle weiteren Werte relativ hierzu angegeben. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (*) im Vergleich zu ausschließlich Toxin-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Im Folgenden wurde der Effekt kombinierter Applikation von TUDCA und SB203580 auf die TcsL-induzierte Apoptose untersucht. TUDCA und SB203580 allein schützten in vergleichbarem Maße vor TcsL-induzierter Apoptose (Abb. 21). Die Kombination von TUDCA und SB203580 verstärkte die anti-apoptotische Wirkung der einzelnen Substanzen (Abb. 21). Um diesen Befund zu erhärten, wurde ebenfalls eine Messung der Caspase-3-Aktivität in Gegenwart von TUDCA und SB203580 durchgeführt. Sowohl TUDCA als auch SB203580 schützten effektiv vor der TcsL-induzierten Caspase-3-Aktivierung, wobei der anti-apoptotische Effekt des SB-Inhibitors geringfügig stärker ausgeprägt war (Abb. 22). Die Kombination aus SB203580 und TUDCA senkte die Caspase-3-Aktivität in TcsL-behandelten Zellen weiter ab. Die Caspase-3-Aktivität war hier lediglich 1,5-fach erhöht, während in ausschließlich TcsL-behandelten Zellen eine 10-fache Aktivierung der Caspase-3 auftrat (Abb. 22). Auch hier verstärkte daher die Kombination aus SB203580 und TUDCA die anti-apoptotische Wirkung der einzelnen Agenzien. Dieses korrelierte mit den Ergebnissen der Phosphatidylserinexternalisierung. Die Beobachtungen deuten daraufhin, dass die p38 MAPK eine Rolle im anti-apoptotischen Effekt von TUDCA spielen könnte.

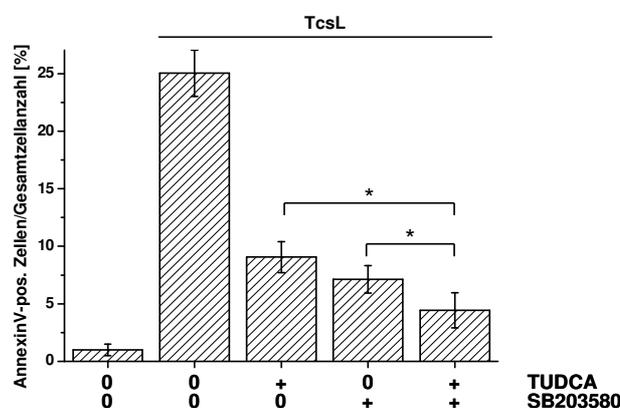


Abb. 21: Verstärkung des anti-apoptotischen Effektes von TUDCA und SB203580 bei kombinierter Applikation.

J774A.1-Zellen wurden für 1 h mit TUDCA (300 μ M) und SB203580 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend für 12 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. Die Phosphatidylserinexternalisierung wurde als Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen zur Gesamtzellanzahl quantifiziert. Ein P-Wert < 0,05 (*) wurde als statistisch signifikant angesehen.

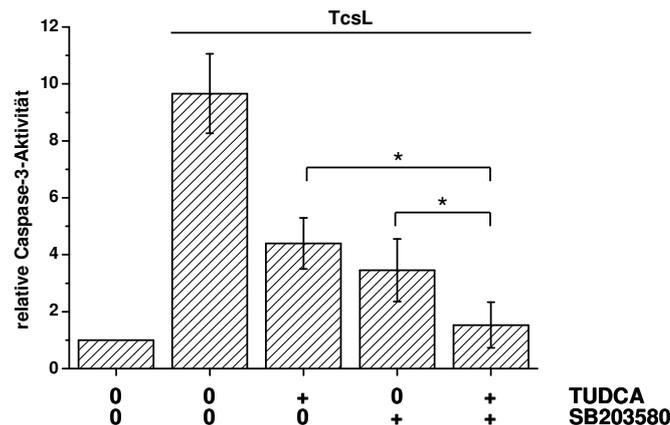


Abb. 22: Die Kombination von TUDCA und SB203580 verstärkt den Schutz vor TcsL-induzierter Caspase-3-Aktivierung.

J774A.1-Zellen wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) und SB203580 (10 μ M) für 1 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden nach 6 h lysiert und die Aktivität der Caspase-3 colorimetrisch bestimmt. Der Wert der unbehandelten Zellen wurde 1,0 gesetzt und alle weiteren Werte relativ hierzu angegeben. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Ein P-Wert < 0,05 (*) wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.8 Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TUDCA

Schoemaker *et al.* zeigten, dass TUDCA in Hepatozyten eine Aktivierung der p38 MAP Kinase induziert. Um die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss von TUDCA auf die Phosphorylierung der p38 MAPK untersucht. In Zellen, die nicht mit TcsL behandelt wurden, führte TUDCA zu einer Phosphorylierung der p38 MAPK (Abb. 23A). Weiterhin verstärkte TUDCA die TcsL-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK (Abb. 23A und 23B). SB203580 reduzierte dagegen die Aktivierung der p38 MAPK sowohl in TcsL- als auch in TcsL- und TUDCA-behandelten Zellen deutlich (Abb. 23A und 23B). TUDCA aktivierte somit die p38 MAPK sowohl in TcsL-behandelten als auch in unbehandelten Zellen. Diese Aktivierung der p38 MAPK war durch SB203580 hemmbar. Somit besitzt TUDCA zwei entgegengesetzte Wirkungen. Einerseits wirkt es durch Erhaltung der PI3K/Akt-Aktivität anti-apoptotisch, andererseits wirkt es durch Aktivierung der p38 MAPK pro-apoptotisch. Letztere Wirkung sollte in der TcsL-behandelten Zelle keine Auswirkungen besitzen, da die p38 MAPK ohnehin aktiviert ist.

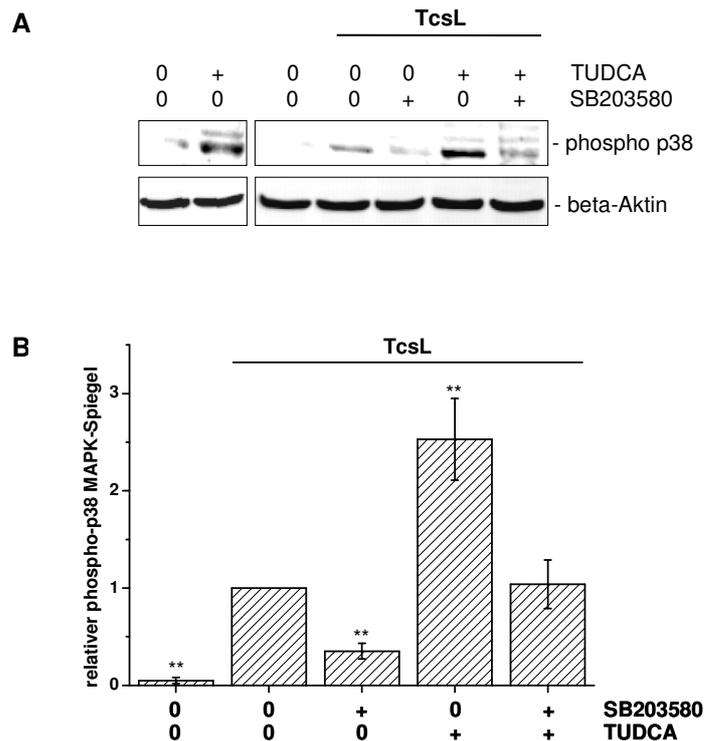


Abb. 23: Keine Hemmung der TcsL-induzierten p38 MAPK-Aktivierung durch TUDCA

Serum-gehungerte J774A.1-Zellen wurden für 1 h mit TUDCA (300 μ M) und SB203580 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend für 2 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. 30 min vor der Zellyse wurde Natriumorthovanadat (1 mM) zugesetzt und der Spiegel von phosphorylierter p38 MAPK im Western-Blot analysiert.

4.9 Hemmung des PI3K/Akt Signalweges durch SB203580

Lali et al. zeigten, dass SB203580 die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1), einen proximalen Regulator der Akt, hemmt. Daher lag es nahe, die Wirkung von SB203580 auf die Akt-Phosphorylierung in J774A.1-Zellen zu untersuchen. In unbehandelten J774A.1-Zellen bewirkte SB203580 eine deutliche Reduktion des phospho-Akt-Spiegels (Abb. 24A und 24B). Diese Abnahme von phospho-Akt war unbeeinflusst von der Anwesenheit von TUDCA (Abb. 24A und 24B), d.h. in Anwesenheit von SB203580 vermochte TUDCA den PI3K/Akt-Signalweg nicht zu aktivieren. In TcsL-behandelten Zellen war unabhängig von der Anwesenheit von SB203580 kein phospho-Akt detektierbar. Interessanterweise wurde die TUDCA-induzierte Erhaltung der PI3K/Akt-Aktivität durch SB203580 aufgehoben. In Gegenwart von SB203580 verlor TUDCA somit seine aktivierende Wirkung auf Akt (Abb. 24A und 24B). Somit besitzt SB203580 zwei entgegengesetzte Wirkungen. Einerseits wirkt es durch Hemmung der p38 MAPK anti-apoptotisch, andererseits wirkt es durch Hemmung von PDK1/Akt pro-

Ergebnisse

apoptotisch. Letztere Wirkung sollte in der TcsL-behandelten Zellen keine Auswirkungen besitzen, da der PI3K/PDK1/Akt-Signalweg ohnehin inaktiviert ist. Somit wirken TUDCA und SB203580 über unterschiedliche Mechanismen anti-apoptotisch. TUDCA erhält die Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs in TcsL-behandelten Zellen. SB203580 hemmt die für die Apoptose erforderliche p38 MAPK-Aktivität.

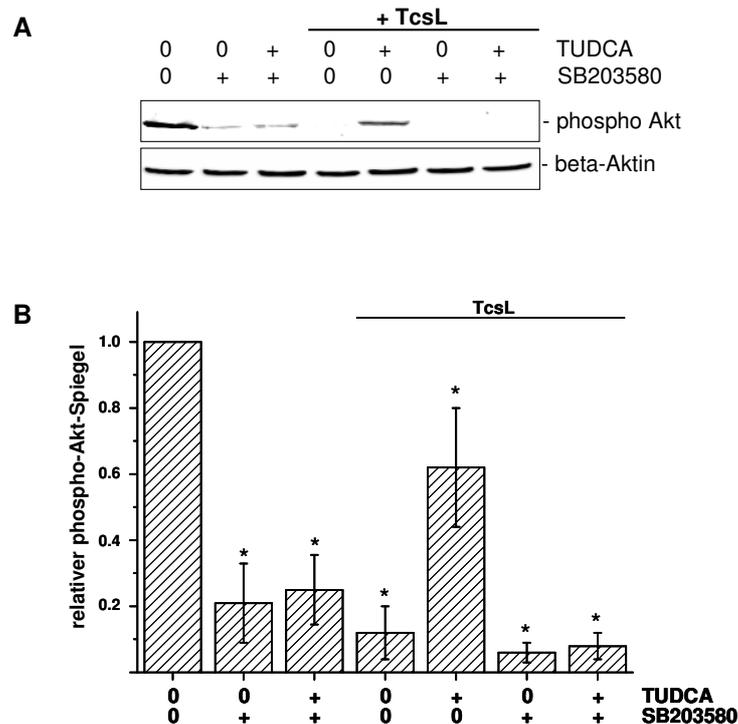


Abb. 24: Keine Erhaltung des PI3K/Akt-Signalwegs in TcsL-behandelten Zellen durch SB203580.

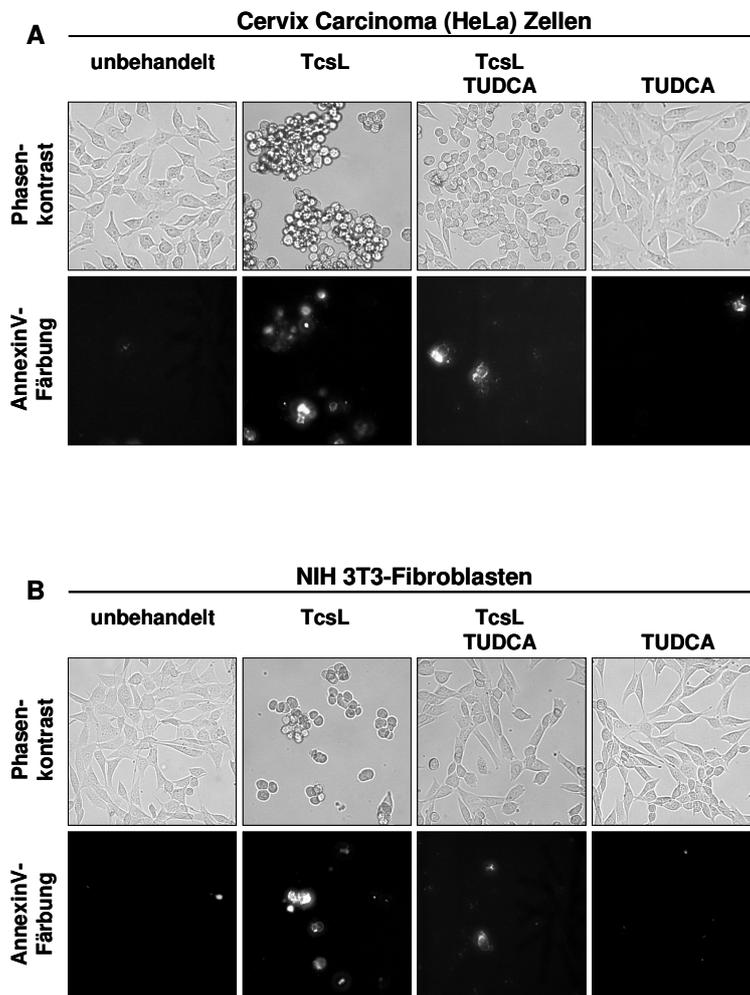
J774A.1-Zellen wurden für 1 h mit TUDCA (300 μ M) und SB203580 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend für 6 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. 30 min vor der Zellyse wurde Natriumorthovanadat (1 mM) zugesetzt und der Spiegel von phospho-Akt im Western-Blot analysiert

4.10 Anti-apoptotische Wirkung von TUDCA in HeLa-Zellen und Fibroblasten

Im Rahmen dieser Studie wurde die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA in TcsL-behandelten J774A.1-Zellen charakterisiert. Darüberhinaus besitzt TUDCA auch eine anti-apoptotische Wirkung in TcsL-behandelten RBL-Zellen (Dreger *et al.*, 2009). Im Folgenden wurde untersucht, ob TUDCA nicht nur in myeloiden Zellen sondern auch in Epithelzellen und Fibroblasten anti-apoptotisch wirkt. TcsL induzierte auch in HeLa-Zellen und Fibroblasten Apoptose, nachgewiesen durch Phosphatidylserinexternalisierung (Abb. 25 A-C). Allerdings ist die Effizienz der

Ergebnisse

Apoptoseinduktion in HeLa Zellen und Fibroblasten deutlich geringer als in J774A.1-Zellen. Während etwa 30 % einer Population von J774A.1-Zellen sensitiv für die TcsL-induzierte Apoptose waren (Abb. 25 C), waren es in HeLa-Zellen und Fibroblasten nur etwa 10 % (Abb. 25C). Unabhängig davon wurde die TcsL-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen und Fibroblasten durch TUDCA unterdrückt (Abb. 25 A-C). Der anti-apoptotische Effekt von TUDCA wurde somit nicht nur in myeloiden Zellen sondern auch in Epithelzellen und Fibroblasten beobachtet und schien somit von genereller Natur zu sein.



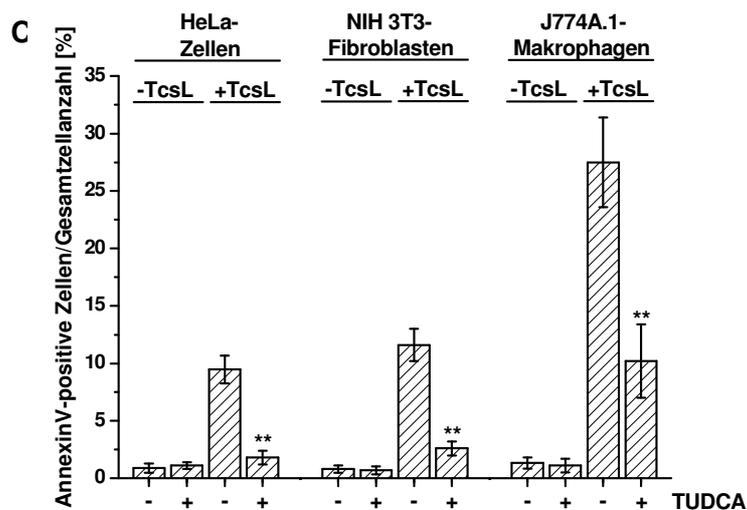


Abb. 25: Anti-apoptotischer Effekt von TUDCA auf die TcsL-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten.

HeLa-Zellen (A) und NIH 3T3-Fibroblasten (B) wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. Die Phosphatidylserinexternalisierung wurde nach 16 h durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Abbildungen zeigen die AnnexinV-Färbung (unten) sowie die korrespondierenden Phasenkontrastbilder (oben). (C) Die TcsL-induzierte Apoptose wurde als Verhältnis von AnnexinV-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellanzahl quantifiziert. Die gezeigten Resultate repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

4.11 Wirkung von TUDCA auf die TcsL-induzierte Aktin-Reorganisation

TcsL induzierte eine Abrundung von HeLa-Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten (Abb. 25A und 25B). Diese morphologische Änderung des Aktinzytoskeletts ist als zytopathischer Effekt beschrieben (Halabi-Cabazon *et al.*, 2008; Voth *et al.*, 2004). TcsL-behandelte Zellen neigen ferner zur Bildung von Clustern, wobei sich die abgerundeten Zellen zu Aggregaten zusammenschließen (Genth *et al.*, 2009; Rupnik, 2008; Chaves-Olarte 1999). Die TcsL-induzierte Zellabrundung ließ sich in J774A.1-Zellen nicht beobachten, da diese von Natur aus rund sind (Abb. 1). Die TUDCA-Behandlung unterdrückte/reduzierte die TcsL-induzierte Zellabrundung und die Clusterbildung in HeLa-Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten (Abb. 26). TUDCA allein induzierte keine Zellabrundung. Da die Zellabrundung auf der Inaktivierung der Rho-Proteinen beruht (Halabi-Cabazon *et al.*, 2008), beeinflusst TUDCA offenbar auch die Aktivität von Rho-Proteinen. Dies ist nicht überraschend, da die PI3K ein proximaler Regulator der Aktivität des Rho-Proteins Rac1 ist.

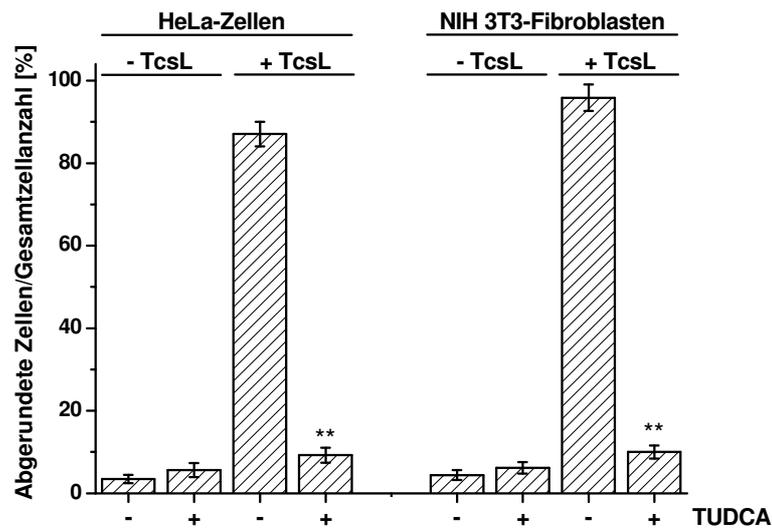


Abb. 26: Hemmung des zytopathischen Effektes durch TUDCA.

HeLa-Zellen und NIH 3T3-Fibroblasten wurden nach Vorinkubation mit TUDCA (300 μ M) für 1 h mit TcsL (100 ng/ml) behandelt. Phasenkontrastbilder wurden nach 16 h aufgenommen und der zytopathische Effekt als Verhältnis von abgerundeten Zellen zur Gesamtzellanzahl durch Auszählung bestimmt. Die gezeigten Resultate repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert < 0,005 (**) im Vergleich zu TcsL-behandelten Zellen wurde als statistisch signifikant angesehen.

5. Diskussion

Trophische Faktoren aktivieren Signalwege, die für das Zellüberleben kritisch sind, und hemmen pro-apoptotische Signalwege. Solche Signalwege schließen vielfach niedermolekulare GTP-bindende Proteine ein. So aktiviert der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) Ras-abhängig den Raf/MEK/Erk-Signalweg und den PI3K/Akt-Signalweg (Henson & Gibson, 2006). Beide Signalwege sind in die Regulation von pro- und anti-apoptotischen Proteinen eingebunden. Der Entzug trophischer Faktoren führt zu einer Hemmung anti-apoptotischer Signalwege wie dem Raf/MEK/Erk-Signalweg oder dem PI3K/Akt-Signalweg und zu einer De-Suppression pro-apoptotischer Signalwege, wie z.B. p38 MAPK-abhängiger Signalwege (Kummer *et al.*, 1997). Beide Ereignisse resultieren in der Initiation von Apoptose.

Die Behandlung von Zellen mit clostridialen glucosylierenden Toxine wie TcdA/TcdB und TcsL zeigt einen vergleichbaren Effekt wie der Entzug der trophischen Faktoren. Die Toxine blockieren Signalwege, die durch trophische Faktoren aktiviert werden, auf der Stufe der niedermolekularen GTP-bindenden Proteine (Abb. 27). Somit bewirkt die Glucosylierung (Inaktivierung) von Rho- und Ras-Proteinen eine Hemmung von kritischen Zellüberlebens-Signalwegen. Es wurde gezeigt, dass Behandlung von Zellen mit TcsL zur Hemmung des Raf/MEK/Erk-Signalweges (Herrmann *et al.*, 1998; Just *et al.*, 1996), des RalGEF/Ral -Signalweges (Schmidt *et al.* 1998) und des PI3K/Akt-Signalweges (Dreger *et al.*, 2009; Voth & Ballard, 2007) führt.

5.1 Kritische Rolle der H/K/N-Ras-Glucosylierung in TcsL-induzierter

Apoptose

Die Identifikation der Signalwege, die für die TcsL-induzierte Apoptose kritisch sind, gestaltete sich schwierig, da TcsL ein breites Substratspektrum von Rho- und Ras-Proteinen glucosyliert und damit inaktiviert. Dies sind H/K/N-Ras, R-Ras, M-Ras, Rap1,2 und RalA aus der Ras-Familie sowie Rac1, RhoG und TC10 aus der Rho-Familie (Genth *et al.*, 2009). Somit kann es eine Vielzahl von Signalwegen geben, deren Hemmung für die TcsL-induzierte Apoptose kritisch ist. Dass die

Diskussion

Glucosylierung von H/K/N-Ras (nicht aber der weiteren Substratproteine) kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose sind, ergab eine vergleichende Studie mit Toxin B aus dem varianten *Clostridium difficile* Serotyp F Stamm 1470 (TcdBF). TcdBF ist als funktionelles Hybrid aus TcdB und TcsL charakterisiert. Die Rezeptorbindedomänen von TcdB und TcdBF sind zu 99 % identisch (Chaves-Olarte *et al.*, 1999). TcsL und TcdBF besitzen bis auf eine Ausnahme ein identisches Substratspektrum: TcsL glucosyliert H/K/N-Ras, während TcdBF H/K/N-Ras nicht glucosyliert (Dreger *et al.*, 2009, Tab. II). Interessanterweise induzierte TcsL, nicht aber TcdBF, Apoptose in einer Vielzahl von Zelllinien, so dass die Glucosylierung von H/K/N-Ras als kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose vorgeschlagen wurde (Dreger *et al.*, 2009).

Toxin	Rho-Familie	Ras-Familie
TcdB/TcdA	Rac1, Cdc42, Rho(A/B/C), RhoG, TC10	-
TcdBF	Rac1, RhoG, TC10	M-Ras, R-Ras, Rap, Ral
TcsL	Rac1, RhoG, TC10	H/K/N-Ras, M-Ras, R-Ras, Rap, Ral

Tab. II: Intrazelluläre Substrate von TcdA/TcdB, TcdBF und TcsL

5.2 Wirkung von TUDCA auf den PI3K/Akt-Signalweg

Kürzlich verdichteten sich Hinweise, dass der H/K/N-Ras-abhängige PI3K/Akt-Signalweg kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose sein könnte (Voth & Ballard, 2007; Dreger *et al.*, 2009). Diese Arbeiten zeigten, dass in TcsL-behandelten HeLa-Zellen und basophilen Leukämie-Zellen der Ratte (RBL-Zellen) Akt nahezu vollständig dephosphoryliert d.h. inaktiv vorlag. Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass TcsL die Akt-Dephosphorylierung auch in Makrophagen-ähnlichen J774A.1-Zellen induzierte (Abb. 13). Die protektive Gallensäure TUDCA wurde in dieser Studie als pharmakologisches Werkzeug genutzt, um die kritische Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der TcsL-induzierten Apoptose zu charakterisieren. Von TUDCA ist bekannt, dass es den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert bzw. dessen Aktivität erhält. Die Behandlung von J774A.1-Zellen mit TUDCA verstärkt PI3K-abhängig die residuale Akt-Phosphorylierung (Aktivierung) (Abb. 12). Diese PI3K-abhängige Aktivierung von Akt durch TUDCA wurde bereits in neuronalen Zellen und Hepatozyten beschrieben (Schoemaker *et al.*, 2004; Solá *et al.*, 2003). In TcsL-

behandelten Zellen (d.h. H/K/N-Ras sind glucosyliert) erhält TUDCA die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges (Abb. 13) unabhängig von H/K/N-Ras.

Die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges wurde weiterhin anhand der Expression des distalen Effektorproteins RhoB untersucht. Das pro-apoptotische Protein RhoB ist ein „immediate early gene“-Produkt. Die Aktivität des *rhoB*-Promotors und damit die RhoB-Expression wird durch H/K/N-Ras PI3K/Akt-abhängig unterdrückt (Jiang *et al.*, 2004). Daher ist der endogene RhoB-Spiegel in Serum-kultivierten Zellen sehr niedrig. Die Inaktivierung von H/K/N-Ras durch TcsL führt zu einer De-Suppression des *rhoB*-Promotors und leitet eine verstärkte RhoB-Expression ein (Huelsenbeck *et al.*, 2007b). TcsL induzierte die Expression von RhoB in J774A.1-Zellen (Abb. 14) und in RBL-Zellen (Dreger *et al.*, 2009). Da TUDCA den PI3K/Akt-Signalweg distal der H/K/N-Ras-Glucosylierung durch TcsL aktiviert, sollte TUDCA auch die TcsL-induzierte Expression von RhoB verhindern. Dieses wird auch beobachtet (Abb. 14). Die zusätzliche Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 führt erneut zu einer starken Expression von RhoB (Abb. 14), LY294002 allein induziert jedoch keine RhoB-Expression (Abb. 14). Somit kann die Expression von RhoB als Marker für die Aktivität des PI3K/Akt-Signales verwendet werden. Die Apoptose-Induktion durch TcsL korrelierte mit der RhoB-Expression. Über welchen Mechanismus RhoB in TcsL-behandelten Zellen pro-apoptotisch wirkt, bleibt zu klären.

5.3 Kritische Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der TcsL-induzierten Apoptose

TcsL induziert Apoptose in einer Vielzahl von kultivierten Zelllinien. Hierzu gehören myeloide Zelllinien wie HL-60 Zellen (Petit *et al.*, 2003), RBL Zellen (Dreger *et al.*, 2009) oder J774A.1-Zellen (diese Studie) sowie Endothelzellen (Hippenstiel *et al.*, 2002), Epithelzellen und Fibroblasten (Abb. 25). In dieser Studie wurde die TcsL-induzierte Apoptose anhand der Endpunkte Phosphatidylserinexternalisierung, Caspase-3 Aktivierung sowie der Reduktion der Viabilität bestimmt.

TUDCA unterdrückt die TcsL-induzierte Apoptose in RBL Zellen (Dreger *et al.*, 2009), in J774A.1 Zellen (Abb. 1-3), in HeLa Zellen sowie in NIH3T3 Fibroblasten (Abb. 25). Dieser „anti-apoptotische Effekt“ von TUDCA ist PI3K/Akt-abhängig, da der anti-apoptotische Effekt sowohl durch den PI3K-Inhibitor LY294002 als auch den Akt-Inhibitor aufgehoben wird (Abb. 9-11). Somit basiert die anti-apoptotische Wirkung

auf dem TUDCA-induzierten Erhalt der PI3K/Akt-Aktivität in TcsL-behandelten Zellen. Dass TUDCA den anti-apoptotischen Effekt distal der H/K/N-Ras Glucosylierung ausübt, wird durch die Beobachtung deutlich, dass erhöhte TcsL-Konzentrationen den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA nicht aufheben (Abb. 2 und 3).

5.4 Mögliche (hemmende) Effekte von TUDCA auf die Aktivität von TcsL

Alternativ könnte die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA auf einer Abschwächung oder Hemmung der TcsL-Wirkung beruhen. Um dies auszuschließen wurde die Wirkung von TUDCA auf verschiedenen Ebenen der TcsL-Wirkung untersucht:

1. Mögliche Konkurrenz am Toxinrezeptor:

TcsL schleust sich mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zielzelle ein („short trip“). Es ist vorstellbar, dass TUDCA die Bindung von TcsL an den (bisher nicht identifizierten) Toxinrezeptor kompetiert. TUDCA ist sowohl bei Vorinkubation als auch bei zeitgleicher Applikation mit TcsL als auch bei Hinzufügen 1 h nach TcsL-Zusatz mit vergleichbarer Effizienz anti-apoptotisch wirksam (Abb. 6). Diese Beobachtung spricht gegen eine Konkurrenz am Toxinrezeptor.

TcsL und TcdB zeigen eine 70 % Identität auf Aminosäureebene; im Bereich der Rezeptorbindedomänen ist die Identität sogar > 90 %. TcsL und TcdB binden daher vermutlich an denselben Rezeptor. TUDCA besitzt keinerlei anti-apoptotische Wirksamkeit im Hinblick auf die TcdB-induzierte Apoptose (Abb. 15 und 16). Daher hemmt TUDCA die Aufnahme von TcdB (und vermutlich auch die Aufnahme von TcsL) nicht. Eine Hemmung der Toxinaufnahme als Ursache der anti-apoptotischen Wirkung von TUDCA in TcsL-behandelten Zellen ist daher unwahrscheinlich.

2. Hemmung der Glucosyltransferase-Aktivität:

Im zellfreien System glucosyliert TcsL die Substratproteine H-Ras und Rac1 unabhängig von der Anwesenheit von TUDCA mit nahezu identischer Kinetik (Abb. 4), was eine Hemmung der Glucosyltransferaseaktivität von TcsL durch TUDCA direkt ausschließt. Auch in TcsL-behandelten Zellen erfolgt die Glucosylierung der TcsL-Substrate Rac1 und H/K/N-Ras in TUDCA-behandelten und Nicht-TUDCA-behandelten Zellen mit vergleichbarer Kinetik (Abb. 5). Eine hemmende Wirkung auf die Glucosyltransferaseaktivität kann somit ausgeschlossen werden.

Zusammengenommen schließen diese Beobachtungen sowohl die Hemmung der Toxinaufnahme als auch die Hemmung der Glucosyltransferaseaktivität als Ursache für den anti-apoptischen Effekt von TUDCA aus. Ein weiterer Hinweis, dass TUDCA nicht über eine Abschwächung der TcsL-Aktivität wirkt, lässt sich aus der Beobachtung ableiten, dass in TcsL-behandelten Zellen die kombinierte Gabe von TUDCA und LY294002 zu einer vergleichbaren Effizienz der Apoptoseinduktion führt wie in TcsL-behandelten Zellen ohne TUDCA und LY294002-Behandlung (Abb. 9 und 10). Schwächte die TUDCA-Behandlung die TcsL-Wirkung ab, sollte sich dies nicht durch LY294002 wiederherstellen lassen.

5.5 Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges durch TcsL

Die Bcl-2-Familie umfasst die anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL als auch pro-apoptische Proteine wie Bad, Bax oder Bid. Die Aktivierung der pro-apoptischen Mitglieder bzw. die Hemmung der anti-apoptischen Mitglieder leitet mitochondrial vermittelte Apoptose ein. Diese ist charakterisiert durch eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, der Freisetzung von Cytochrom C, der Aktivierung des Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und schließlich der Aktivierung von Caspasen (Youle & Strasser, 2008).

Bcl-xL und Bid werden beide durch Akt reguliert. Somit sind der H/K/N-Ras/PI3K/Akt-Signalweg und der mitochondriale Zelltod-Signalweg miteinander verbunden. Die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges durch das H/K/N-Ras-glucosylierende TcsL sollte somit die Aktivierung von Bcl-2 Proteinen beeinflussen. Sowohl Bcl-xL als auch Bid werden in TcsL-behandelten HeLa-Zellen gespalten (Voth & Ballard, 2007). Die Caspase-abhängige Spaltung des anti-apoptischen Bcl-xL resultiert in einem pro-apoptischen Fragment, das sich in die Mitochondrienmembran einlagern kann und dort zur Freisetzung von Cytochrom C führt (Voth & Ballard, 2007). Eine andere Studie schlägt vor, dass die Überexpression des anti-apoptischen Bcl-2 einen Schutz vor TcsL-induzierter Apoptose vermittelt (Petit *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Studie sollten die Konsequenzen der TUDCA-Wirkung auf die Aktivität der Bcl-2-Proteine untersucht werden. Die zelluläre Konzentration der Bcl-2-Proteine ist in J774A.1-Zellen und in RBL-Zellen offenbar sehr niedrig, so dass sie sich der Detektion mittels Westernblot-Analyse entziehen.

Infolge der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien wird der apoptotische Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) aktiviert. Dieser bildet zusammen mit der Pro-

Caspase-9 einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird (Li *et al.*, 1997). Die dadurch aktivierte Caspase-9 leitet dann die Aktivierung von Effektor-Caspasen wie der Caspase-3 ein, welche folgend die Apoptose exekutieren. Petit *et al.* zeigten, dass Caspase-9 und Caspase-3 sequentiell in TcsL-behandelten HL-60-Zellen gespalten und damit aktiviert werden (Petit *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass TcsL die Aktivierung der Caspase-3 in J774A.1-Zellen (Abb. 11) und in RBL-Zellen induziert (Dreger *et al.*, 2009). Die Hemmung von Caspasen durch den Breitspektrum-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk verhindert die Aktivierung der Caspase-3 und reduziert die Externalisierung von Phosphatidylserin in TcsL-behandelten RBL Zellen (Dreger *et al.*, 2009). Dieses unterstreicht die kritische Rolle der Caspasen in TcsL-induzierter Apoptose. TUDCA reduzierte PI3K/Akt-abhängig die TcsL-induzierte Caspase-3-Aktivierung in J774A.1-Zellen (Abb. 11). Diese Beobachtung bestätigt den ursächlichen Zusammenhang zwischen Apoptose und der Hemmung des Ras/PI3K/Akt-Signalweg durch TcsL.

5.6 Keine Hemmung TcdA/TcdB-induzierter Apoptose durch TUDCA

TcdA und TcdB glucosylieren die Rho-Proteine RhoA/B/C, Rac1, RhoG, TC10, TCL und Cdc42. Neben den Ras-Proteinen glucosyliert TcsL Rac1, RhoG, TC10, TCL und Cdc42. TcdA und TcdB induzieren (wie TcsL) Apoptose in J774A.1-Zellen. Die TcdA/TcdB-induzierte Apoptose wurde mit den Endpunkten Phosphatidylserinexternalisierung und der Abnahme der Aktivität zellulärer Dehydrogenasen bestimmt. Im Gegensatz zu TcsL ließ sich die TcdA-/TcdB-induzierte Apoptose nicht durch TUDCA unterdrücken (Abb. 15 und 16). Somit erhält/aktiviert TUDCA keinen Rho-abhängigen Signalweg, der kritisch für die TcdA-/TcdB-induzierte Apoptose ist. Diese Beobachtung unterstützte unsere Sicht, dass TUDCA unterhalb der H/K/N-Ras-Glucosylierung über die Erhaltung der Aktivität des PI3K/Akt Signalweges anti-apoptotisch wirkt. Somit unterscheidet sich der Mechanismus der TcsL-induzierten Apoptose von der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose. Dies wurde von einigen Arbeitsgruppen bisher anders gesehen. Aufgrund der hohen Identität von TcdB und TcsL wurde für beide Toxine ein vergleichbarer Mechanismus der Apoptose-Induktion angenommen (Petit *et al.*, 2003; Mataresse *et al.*, 2007). Dieser Vorschlag basiert auf der Annahme, dass die Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen lediglich für die Toxin-induzierte Aktin-Reorganisation verantwortlich ist und die Apoptose auf einer direkten (Glucosyltransferase-unabhängigen) Wirkung des Toxinmoleküls auf

die Mitochondrien (z.B. Porenbildung u.ä.) beruht. Kürzlich erschienene Studien zeigen jedoch, dass die Glucosyltransferase-Aktivität der Toxine essentiell für die Aktin-Reorganisation als auch für die Apoptose ist (Nottrott *et al.*, 2008; Dreger *et al.* 2009).

Während die H/K/N-Ras-Glucosylierung für die TcsL-induzierte Apoptose kritisch ist, ist es möglicherweise die RhoA Glucosylierung in der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose. RhoA-Glucosylierung induziert (vergleichbar der H/K/N-Ras Glucosylierung) über einen bisher nicht-charakterisierten Signalweg die Expression des pro-apoptotischen RhoB (Huelsenbeck *et al.* 2007b). RhoB ist essentiell für die TcdA/TcdB-induzierte Apoptose, denn RhoB-Hemmung blockiert die Apoptose (Huelsenbeck *et al.* 2007b). Vermutlich ist die RhoB-Expression ebenso essentiell für die TcsL-induzierte Apoptose. Dies bleibt zu zeigen.

5.7 Aktivierung der p38 MAPK durch clostridiale glucosylierende Toxine

Aus der Literatur ist bekannt, dass Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen durch die glucosylierenden Toxine eine Aktivierung der p38 MAPK in verschiedenen Zelllinien hervorruft (Gerhard *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2007; Geny *et al.*, 2009). In dieser Studie wurde gezeigt, dass TcsL und TcdA die p38 MAPK in J774A.1-Zellen aktivieren (Abb. 18). Diese Aktivierung könnte auf zwei Effekten der Toxine beruhen:

1. Zellen reagieren auf die Hemmung wichtiger Überlebenssignalwege mit der Aktivierung der p38 MAPK (Kummer *et al.*, 1997). So könnte die Glucosylierung von Rho/Ras-Proteinen die p38 MAPK-Aktivierung auslösen.

2. Änderungen der Aktindynamik (ausgelöst z.B. durch Aktin-depolymerisierende Agentien) führen zu einer p38 MAPK-Aktivierung (Meyer *et al.*, 2007). So könnte die Toxin-induzierte Aktin-Reorganisation ebenso die p38 MAPK-Aktivierung verursachen.

Die TcdA/TcsL-induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK ist durch den p38 MAPK-Inhibitor SB203580 hemmbar (Abb. 18). Eine Hemmung der p38 MAPK-Phosphorylierung durch SB203580 wird auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Capano & Crompton, 2006; Schoemaker *et al.*, 2004).

5.8 Pro-apoptotische Rolle der p38 MAPK in der Apoptose clostridialer glucosylierender Toxine

Eine pro-apoptotische Rolle der p38 MAPK ist in der TcdA-induzierten Apoptose beschrieben (Kim *et al.*, 2005b). Wir fanden, dass sowohl die TcdA- als auch die TcsL-induzierte Apoptose von der Aktivität der p38 MAPK abhängt, denn SB203580 schützte sowohl vor TcdA- als auch vor TcsL-induzierter Apoptose (Abb. 19 und 20). Somit wirkt die p38 MAPK sowohl in TcdA- als auch in TcsL-behandelten J774A.1-Zellen pro-apoptotisch. Der p38 MAPK wird oftmals eine pro-apoptotische Aktivität zugeschrieben, da die p38 MAPK pro-apoptotische Signalwege aktiviert und Überlebenssignalwege unterdrückt (Porras *et al.*, 2004).

5.9 Pleiotrophe Effekte von SB203580 und TUDCA

In dieser Studie beobachten wir, dass SB203580 eine Akt Dephosphorylierung in J774A.1-Zellen induziert (Abb. 24). Diese Wirkung von SB203580 wurde auch von anderen Gruppen in RPE (retinal pigment epithelial)-Zellen und Hepatozyten beobachtet (Fernandes *et al.*, 2009; Schoemaker *et al.* 2004). Sie beruht vermutlich auf der Hemmung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase 1 (PDK1) durch SB203580. Die PDK1 vermittelt PI3K-abhängig die Phosphorylierung von Akt (Lali *et al.*, 2000). Diese Wirkung von SB203580 erklärt, warum SB203580 die TUDCA-induzierte Akt-Phosphorylierung reduziert (Abb. 24). Ob der anti-apoptotische Effekt von TUDCA durch SB203580 aufgehoben wird, ließ sich nicht klären, da die Apoptose in Anwesenheit von SB203580 in jedem Fall blockiert ist. Die anti-apoptotische Wirkung von SB203580 in TcsL-behandelten Zellen beruht somit auf der Hemmung der p38 MAPK. Die zusätzliche Induktion der Akt- Dephosphorylierung durch SB203580 ist vermutlich ohne Auswirkung, da Akt in TcsL-behandelten Zellen bereits dephosphoryliert ist.

TUDCA wirkt neben der Aktivierung von PI3K/Akt auch auf die p38 MAPK. Wir beobachteten, dass TUDCA in unbehandelten J774A.1-Zellen die p38 MAPK aktiviert bzw. die TcsL-induzierte p38 Aktivierung weiter verstärkt (Abb. 23). Eine p38 MAPK-Aktivierung durch TUDCA wird ebenfalls in Hepatozyten beobachtet (Schoemaker *et al.*, 2004). Der Mechanismus der TUDCA-induzierten p38 MAPK-Aktivierung bleibt zu klären. TUDCA beeinflusst somit sowohl den PI3K/Akt- als auch den p38 MAPK-Signalweg. Die anti-apoptotische Wirkung von TUDCA in TcsL-

Diskussion

behandelten Zellen beruht somit höchstwahrscheinlich auf dem Erhalt der Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges. Die zusätzliche Aktivierung der p38 MAP Kinase durch TUDCA ist vermutlich ohne Auswirkung, da die p38 MAPK in TcsL-behandelten Zellen bereits stark aktiviert ist.

Daher ergibt sich folgende Schlußfolgerung:

Die Inaktivierung von H/K/N-Ras durch TcsL führt zu einer Hemmung des anti-apoptotischen PI3K/Akt-Signalweges und zu einer De-Suppression des pro-apoptotischen p38 MAPK-Signalweges. Daraus resultiert die Induktion von Apoptose. Für die Einleitung der Apoptose in TcdA/TcdB-behandelten Zellen ist vermutlich die Inaktivierung von RhoA kritisch. TcdA/TcdB induzieren Apoptose ebenfalls über eine Aktivierung der p38 MAPK, der PI3K/Akt-Signalweg ist hier jedoch nicht in die Apoptoseinitiation eingebunden. Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (nicht die Aktivierung der p38 MAPK) ist ferner für den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA in TcsL-behandelten Zellen kritisch. Für die anti-apoptotische Wirkung von SB203580 ist die Hemmung der p38 MAPK (nicht die Hemmung von Akt) ursächlich.

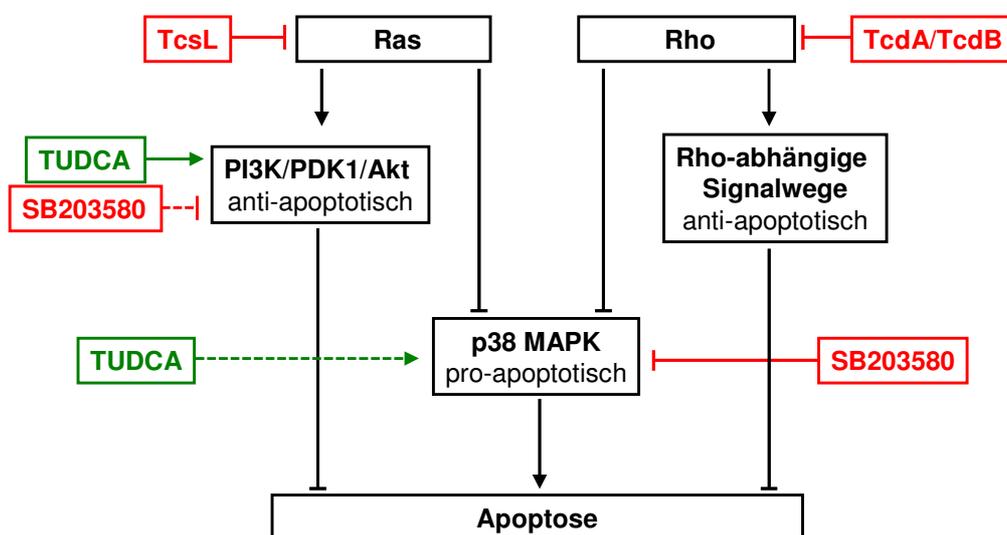


Abb. 27: Kritische Signalwege in TcsL- und TcdA/TcdB-induzierter Apoptose.

TcsL und TcdA/TcdB inaktivieren niedermolekulare GTP-bindende Proteine der Rho- und Ras-Familie. Die Hemmung von Rho- und Ras-Proteinen leitet eine Aktivierung der p38 MAPK ein. Die TcsL-induzierte Inaktivierung von H/K/N-Ras führt zu einer Hemmung des PI3K/PDK1/Akt-Signalweges. Die TcsL-induzierte Apoptose wird sowohl durch Erhaltung der PI3K/PDK1/Akt-Signalweitergabe als auch durch Hemmung der p38 MAPK durch SB203580 verhindert. SB203580, nicht aber TUDCA, schützt ebenfalls vor der TcdA/TcdB-induzierten Apoptose. Die TUDCA-induzierte Aktivierung der p38 MAPK ist nicht in den anti-apoptotischen Effekt von TUDCA eingebunden. Die SB203580-induzierte Hemmung des PI3K/PDK1/Akt-Signalweges ist nicht für die anti-apoptotische Wirkung von SB203580 ursächlich.

5.10 Möglicher Beitrag der TcsL-induzierten Apoptose in der *C. sordellii*-assoziierten Erkrankung

Einige *Clostridium sordellii*-assoziierte Erkrankungen bedingen das Verbleiben von *C. sordellii* am Infektionsort (Sinave *et al.*, 2002). Eukaryotische Wirtszellen reagieren auf eine bakterielle Infektion mit der Aktivierung des Immunsystems und der Aktivierung von phagozytierenden Zellen. Um ein Überleben am Infektionsort zu sichern und phagozytierenden Zellen zu entkommen, bilden viele Bakterien Virulenzfaktoren, welche die Apoptose phagozytierender Zellen einleiten. So sezerniert beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa* das Effektorprotein Exoenzym S, um die Apoptose in Makrophagen des Wirts einzuleiten (Jansson *et al.*, 2006). TcsL könnte eine vergleichbare Funktion in der *C. sordellii*-assoziierten Erkrankung einnehmen. Möglicherweise erklärt dies ebenfalls, dass myeloide Zellen sensitiver gegenüber der TcsL-induzierten Apoptose als epitheliale oder endotheliale Zellen sind (Petit *et al.*, 2003). Der Verlust der Phagozytose könnte weiterhin mit dem Auftreten starker Nekrosen am Infektionsort assoziiert sein. Abgestorbene Zellen verbleiben am Infektionsort und setzen Faktoren frei, die zu einer weiteren Aktivierung des Immunsystems beitragen. Dieses bedingt die Entstehung von Nekrosen, da die Aktivität phagozytierender Zellen blockiert ist.

Eine Vielzahl von Erkrankungen wird mit fehlregulierter Apoptose in Verbindung gebracht. Überschießende Apoptose kann in der Depletion von T-Zellen, in neurodegenerativen Erkrankungen sowie in degenerativen Lebererkrankungen resultieren. Aufgrund seiner anti-apoptotischen Wirkung laufen klinische Studien, um einen möglichen Einsatz von TUDCA als Modulator Apoptose-assoziiierter Erkrankungen zu erforschen. TUDCA ist ein (in den USA) zugelassenes Pharmakon, das bei biliärer Zyrrose, sklerosierender Cholangitis und anderen cholestatischen Krankheiten eingesetzt wird (Solá *et al.*, 2007). Auch die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder der Chorea Huntington mit TUDCA wird derzeit untersucht (Ramalho *et al.*, 2007; Solá *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2002). Unter der Annahme, dass TcsL-induzierter Zelltod zum Krankheitsbild der *C. sordellii*-assoziierten Erkrankungen beiträgt, könnte TUDCA zur Linderung dieser Erkrankungen beitragen (Abb. 28).

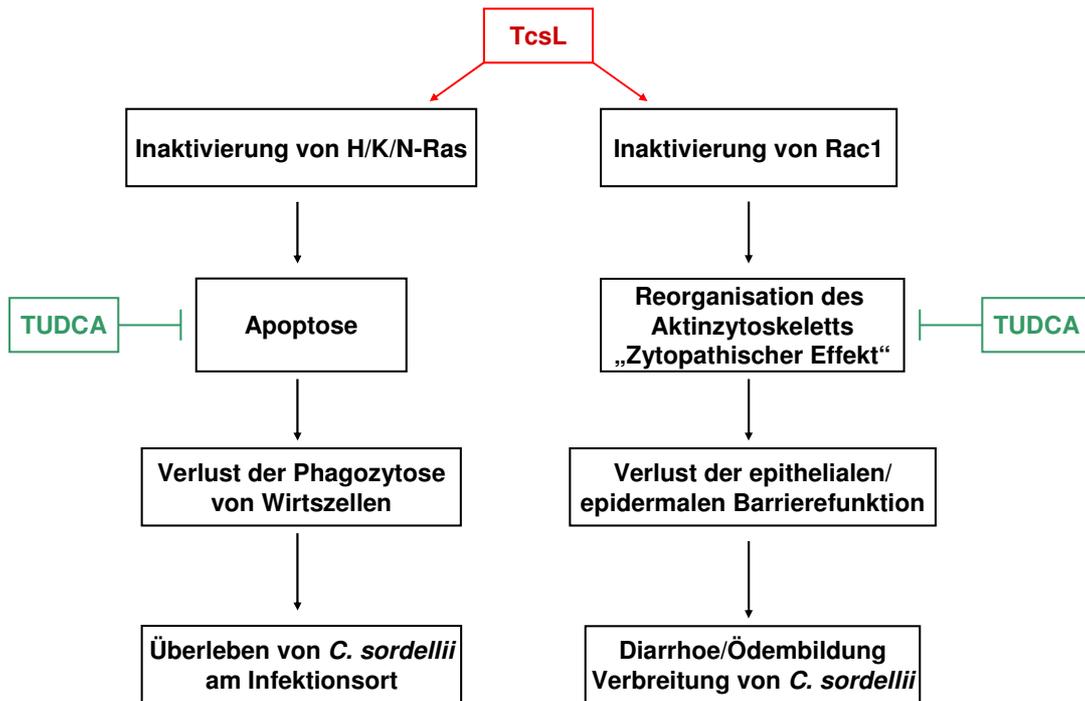


Abb. 28: Modell zur Wirkung von TcsL in *C. sordellii*-assoziierten Erkrankungen.

TcsL induziert eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts und leitet Apoptose ein. Apoptose bedingt einen Verlust der Phagozytose des Wirtes und sichert dadurch ein Überleben von *C. sordellii* am Infektionsort. Der zytopathische Effekt resultiert in einem Verlust der epithelialen/epidermalen Barrierefunktion und ermöglicht dadurch die Verbreitung von *C. sordellii*.

6. Ausblick

Wirkung von TUDCA auf die TcsL-induzierte Aktinreorganisation

Während die H/K/N-Ras-Glucosylierung kritisch für die TcsL-induzierte Apoptose ist, ist vermutlich die Rac1-Glucosylierung kritisch für die TcsL-induzierte Aktin-Reorganisation und Zellabrundung (Halabi-Cabezon *et al.*, 2008). Die Aktivität von Rac1 wird u.a. PI3K/ Dock180/ELMO-abhängig reguliert (Disanza *et al.*, 2005). Weiterhin wird die Rac1-Aktivität durch die Akt-abhängige Phosphorylierung an Ser-71 beeinflusst (Kwon *et al.*, 2000). Wir beobachteten, dass die TUDCA-Behandlung die TcsL-induzierte Zellabrundung reduzierte (Abb. 25 und 26). Die TUDCA-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges besitzt somit nicht nur Auswirkungen auf die TcsL-induzierte Apoptose sondern auch auf die TcsL-induzierte Aktin-Reorganisation. Die Zerstörung der intestinalen Barrierefunktion, die auf der TcsL-induzierten Aktin-Reorganisation beruht, ist ein weiterer wichtiger Aspekt *C. sordellii*-assoziierter Erkrankungen (Abb. 28; Boehm *et al.*, 2006). TcsL induziert einen Verlust der Adhärenz-Verbindungen zwischen benachbarten Zellen und erhöht die epitheliale Permeabilität. Dieses könnte die Entstehung der Diarrhoe bei *C. sordellii*-assoziierter Enteritis in Nutztieren erklären. Die Untersuchung der Wirkung von TUDCA auf die TcsL-induzierte Aktin-Reorganisation bleibt einer Folgestudie vorbehalten.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Apaf-1	Protease-Aktivierungsfaktor-1
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	"Bcl-2-Antagonist of Cell Death"
Bax	"Bcl-2-associated X protein"
Bcl	"B-cell lymphoma"
Bid	"BH3 interacting domain death agonist"
bzw.	beziehungsweise
C.	Clostridium
CAAX-Motiv	Aminosäuremotiv
Caspase	Cystein-Aspartat-spezifische Protease
Cdc42	"cell division cycle 42"
CGT	Clostridiale glucosylierende Toxine
CROP	„combined repetitive oligopeptide“
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DHC-Motiv	Aminosäure-Motiv
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DXD-Motiv	Aminosäure-Motiv
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
<i>et al.</i>	und andere
FCS	Fetales Kälber Serum
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanidinnukleotiddissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanidinnukleotidaustauschfaktor

Abkürzungsverzeichnis

Gpbar-1	G-Protein gekoppelter Gallensäurerezeptor-1
GSK 3	Glycogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTD	Glucosyltransferasedomäne
GTP	Guanosintriphosphat
GUDCA	Glucoursodeoxycholsäure
h	Stunde
HeLa-Zellen	Humane Epithelzelllinie eines Zervixcarcinoms
His	Histidin
InsP6	Inositolhexaphosphat
J774A.1-Zellen	Makrophagen-ähnliche Zelllinie der Maus
JNK	c-Jun aminoternale Kinase
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LY294002	PI3K-Inhibitor
M	Mol/Liter
m	Meter
Mab	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
min	Minute
MK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
NFkappaB	"nuclear factor of activated B-cells"
NIH 3T3 Fibroblasten	Embryonale Fibroblastenzelllinie der Maus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
psi	Druckeinheit ("pound per square inch")
Raf	"Rat fibrosarcoma"

Abkürzungsverzeichnis

Ran	"Ras-related nuclear protein"
Ras	"Rat sarcoma"
RBD	Rezeptorbindedomäne
RBL-Zellen	Basophile Leukämiezelllinie der Ratte
Rho	Ras homologes Protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinal Pigment epitheliale Zellen
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium ("Roswell Park Memorial Institute")
SB203580	p38 MAPK-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TcdA	Toxin A (<i>Clostridium difficile</i>)
TcdB	Toxin B (<i>Clostridium difficile</i>)
TcdBF	Toxin B Serotyp F (<i>Clostridium difficile</i>)
TcsH	Hämorrhagisches Toxin (<i>Clostridium sordellii</i>)
TcsL	Letales Toxin (<i>Clostridium sordellii</i>)
Thr	Threonin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UDP	Uridindiphosphat
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-fmk	Breitspektrum-Caspase-Inhibitor

8. Literaturangaben

- Aktories K, Just I. 2005. Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr Top Microbiol Immunol*. 291:113-45.
- Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL. 2006. *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment. *Clin Infect Dis*. 43(11):1436-46.
- Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2009. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res*. [Epub ahead of print].
- Barth H, Pfeifer G, Hofmann F, Maier E, Benz R, Aktories K. 2001. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J Biol Chem* 276: 10670–10676.
- Bartlett JG. 1994. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about organism. *Clin Infect Dis* 18: 265-272.
- Bayerdörffer E, Mannes GA, Richter WO, Ochsenkühn T, Wiebecke B, Köpcke W, Paumgartner G. 1993. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 104(1):145-51.
- Bernards A. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochem Biophys Acta* 1603: 47-82.
- Boehm C, Gibert M, Geny B, Popoff MR, Rodriguez P. 2006. Modification of epithelial cell barrier permeability and intercellular junctions by *Clostridium sordellii* lethal toxins. *Cell Microbiol*. 8(7):1070-85.
- Boquet P, Lemichez E. 2003. Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol*. 13(5):238-46.
- Boquet P, Munro P, Fiorentini C, Just I. 1998. Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. *Curr Opin Microbiol* 1: 66-74.
- Busch C, Aktories K. 2000. Microbiological toxins and the glycosylation of Rho family GTPases. *Curr Opin Struck Biol* 10: 528-535.
- Busch C, Hofmann F, Selzer J, Munro S, Jeckel D, Aktories K. 1998 . A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem*. 273(31):19566-72.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296(5573):1655-7.
- Capano M, Crompton M. 2006. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem J*. 395(1):57-64.
- Castro RE, Solá S, Ma X, Ramalho RM, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CM. 2005. A distinct microarray gene expression profile in primary rat hepatocytes incubated with ursodeoxycholic acid. *J Hepatol*. 42(6):897-906.
- Chaves-Olarte E, Löw P, Freer E, Norlin T, Weidmann M, von Eichel-Streiber C, Thelestam M. 1999. A novel cytotoxin from *Clostridium difficile* serogroup F is a functional hybrid between two other large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem*. 1999 274(16):11046-52.
- Chiang JY. 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 40(3):539-51.
- Cox AD, Der CJ. 2003. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22(56):8999-9006.

Literaturangaben

- Cox AD, Der CJ. 2002. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther.* 1(6):599-606.
- Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. 2001. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.* 11:220-230.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13(22):2905-27.
- Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 62(9):955-70.
- Dreger SC, Schulz F, Huelsenbeck J, Gerhard R, Hofmann F, Just I, Genth H. 2009. Killing of Rat Basophilic Leukemia Cells by Lethal Toxin from *Clostridium sordellii*: Critical Role of Phosphatidylinositide 3'-OH Kinase/Akt Signaling (dagger). *Biochemistry* [Epub ahead of print].
- Duan WM, Rodrigues CM, Zhao LR, Steer CJ, Low WC. 2002. Tauroursodeoxycholic acid improves the survival and function of nigral transplants in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Transplant.* 11(3):195-205.
- Egerer M, Giesemann T, Herrmann C, Aktories K. 2009. Autocatalytic processing of *Clostridium difficile* toxin B. Binding of inositol hexakisphosphate. *J Biol Chem.* 284(6):3389-95.
- Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJ, Aktories K. 2007. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *J Biol Chem.* 282(35):25314-21.
- Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. 1999. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest.* 103(1):137-45.
- Fernandes AF, Bian Q, Jiang JK, Thomas CJ, Taylor A, Pereira P, Shang F. 2009. Proteasome inactivation promotes p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation and increases interleukin-8 production in retinal pigment epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 20(16):3690-9.
- Florentini C, Falzano L, Travaglione S, Fabbri A. 2003. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria. *Cell Death Differ.* 10(2):147-52.
- Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, Watanabe G, Bito H, Saito Y, Hall A, Narumiya S. 1998. Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J. Biol. Chem.* 273:18943-18949.
- Gaestel M. 2006. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(2):120-30.
- Genth H, Schulz F, Just I. 2009. Glucosylation of Rho/Ras proteins by Lethal Toxin – implications of actin re-organization and apoptosis in *C.sordellii*-associated disease. *The Open Toxicology Journal.* Accepted for publication.
- Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I. 2008. *Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(4):592-7.
- Genth H, Huelsenbeck J, Hartmann B, Hofmann F, Just I, Gerhard R. 2006. Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B. *FEBS Lett.* 580(14):3565-9.
- Genth H, Aktories K, Just I. 1999. Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem.* 274(41):29050-6.
- Geny B, Popoff MR. 2009 . Activation of a c-Jun-NH2-terminal kinase pathway by the lethal toxin from *Clostridium sordellii*, TcsL-82, occurs independently of the toxin intrinsic enzymatic activity and facilitates small GTPase glucosylation. *Cell Microbiol.* 11(7):1102-13.

Literaturangaben

- Gerhard R, Tatge H, Genth H, Thum T, Borlak J. 2005. *Clostridium difficile* toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. *J Biol Chem* 280: 1499-1505.
- Geyer M, Wilde C, Selzer J, Aktories K, Kalbitzer HR. 2003. Glucosylation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin: consequences for effector loop conformations observed by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 42(41):11951-9.
- Halabi-Cabezón I, Huelsenbeck J, May M, Ladwein M, Rottner K, Just I, Genth H. 2008. Prevention of the cytopathic effect induced by *Clostridium difficile* Toxin B by active Rac1. *FEBS Lett.* 582(27):3751-6.
- Hall A, Nobes CD. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355(1399):965-70.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. 2006. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 5):647-62.
- Henson ES, Gibson SB. 2006. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell Signal.* 18(12):2089-97.
- Herrmann C, Ahmadian MR, Hofmann F, Just I. 1998 Functional consequences of monoglucosylation of Ha-Ras at effector domain amino acid threonine 35. *JBC* 273: 16134-16139.
- Higuchi H, Gores GJ. 2003. Bile acid regulation of hepatic physiology: IV. Bile acids and death receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284(5):G734-8.
- Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD, Seybold J, Krüll M, Preissner K, Eichel-Streiber CV, Suttorp N. 2002. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283(4):L830-8.
- Huelsenbeck SC, Klose I, Reichenbach M, Huelsenbeck J, Genth H. 2009. Distinct kinetics of (H/K/N)Ras glucosylation and Rac1 glucosylation catalysed by *Clostridium sordellii* lethal toxin. *FEBS Lett.* [Epub ahead of print].
- Huelsenbeck J, Dreger SC, Gerhard R, Barth H, Just I, Genth H. 2007a. Difference in the cytotoxic effects of Toxin B from *Clostridium difficile* Strain VPI 10463 and Toxin B from Variant *Clostridium difficile* Strain 1470. *Infection and Immunity* 75:801-809.
- Huelsenbeck J, Dreger S, Gerhard R, Fritz G, Just I, Genth H. 2007b. Up-regulation of the immediate early gene product RhoB by Exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and Toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry.* 46(16):4923-31.
- Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:247-269.
- Jank T, Aktories K. 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol.* 16(5):222-9.
- Jank T, Giesemann T, Aktories K. 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology.* 2007 17(4):15R-22R.
- Jansson AL, Yasmin L, Warne P, Downward J, Palmer RH, Hallberg B. 2006. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is not able to induce apoptosis when cells express activated proteins, such as Ras or protein kinase B/Akt. *Cell Microbiol.* 8(5):815-22.
- Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sefti S. 2004. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol.* 24(12):5565-76.
- Just I, Gerhard R. 2004. Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem* 152: 23-47.
- Just I, Hofmann F, Genth H, Gerhard R 2001. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int.J.Med.Microbiol.* 291: 243-250.

Literaturangaben

- Just I, Selzer J, Hofmann F, Green GA, Aktories K. 1996. Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J Biol Chem.* 271(17):10149-53.
- Just I, Selzer J, Wilm M, Von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. 1995a. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375:500–503.
- Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, Von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. 1995b. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 270: 13932–13936.
- Keitel V, Kubitz R, Häussinger D. 2008. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol.* 14(37):5620-9.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 278(11):9435-40.
- Kelly CP, LaMont JT. 1998. *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev Med* 49: 375-39.
- Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont, JT. 1994. *Clostridium difficile* colitis. *New England J Med* 330: 257-262.
- Kim H, Rhee SH, Kokkotou E, Na X, Savidge T, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT. 2005a. *Clostridium difficile* toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. *J Biol Chem.* 280(22):21237-45.
- Kim H, Kokkotou E, Na X, Rhee SH, Moyer MP, Pothoulakis C, Lamont JT. 2005b. *Clostridium difficile* toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology.* 129(6):1875-88.
- Kimura AC, Higa JI, Levin RM, Simpson G, Vargas Y, Vugia DJ. 2004. Outbreak of necrotizing fasciitis due to *Clostridium sordellii* among black-tar heroin users. *Clin Infect Dis.* 38(9):e87-91.
- Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciano P, Downward J, Parker PJ. 1994. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol.* 4(9):798-806.
- Kolch W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *J. Biochem.* 351: 289-305.
- Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC. 1999. Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 263(3):825-31
- Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA. 1997. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272(33):20490-4.
- Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem.* 275(1):423-8.
- Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM. 2000. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 275(10):7395-402.
- Lamcharfi E, Cohen-Solal C, Parquet M, Lutton C, Dupré J, Meyer C. 1997. Determination of molecular associations of some hydrophobic and hydrophilic bile acids by infrared and Raman spectroscopy. *Eur Biophys J.* 25(4):285-91.
- Lawlor MA, Alessi DR. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Cell Sci.* 114(Pt 16):2903-10.

Literaturangaben

- Lewis CJ, Naylor RD. 1998. Sudden death in sheep associated with *Clostridium sordellii*. *Vet Rec.* 142(16):417-21.
- Lee JY, Kim H, Cha MY, Park HG, Kim YJ, Kim IY, Kim JM. 2009. *Clostridium difficile* toxin A promotes dendritic cell maturation and chemokine CXCL2 expression through p38, IKK, and the NF-kappaB signaling pathway. *J Mol Med.* 87(2):169-80.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91(4):479-89.
- Manteca C, Daube G, Pirson V, Limbourg B, Kaeckenbeeck A, Mainil JG. 2001. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Vet Microbiol.* 81(1):21-32.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K. 2002. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun.* 298(5):714-9.
- Matarrese P, Falzano L, Fabbri A, Gambardella L, Frank C, Geny B, Popoff MR, Malorni W, Fiorentini C. 2007. *Clostridium difficile* toxin B causes apoptosis in epithelial cells by thrilling mitochondria. Involvement of ATP-sensitive mitochondrial potassium channels. *J Biol Chem.* 282(12):9029-41.
- Meyer GK, Neetz A, Brandes G, Tsikas D, Butterfield JH, Just I, Gerhard R. 2007. *Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells. *Infect Immun.* 75(8):3868-76.
- Miller SD, Greene CM, McLean C, Lawless MW, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG. 2007. Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of Bad. *Hepatology.* 46(2):496-503.
- Miura T, Ouchida R, Yoshikawa N, Okamoto K, Makino Y, Nakamura T, Morimoto C, Makino I, Tanaka H. 2001. Functional modulation of the glucocorticoid receptor and suppression of NF-kappaB-dependent transcription by ursodeoxycholic acid. *J Biol Chem.* 276(50):47371-8.
- Nottrott S, Schoentaube J, Genth H, Just I, Gerhard R. 2008. *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis is p53-independent but depends on glucosylation of Rho GTPases. *Apoptosis.* 12(8):1443-53.
- Olofsson B. 1999. Rho Guanine Dissociation Inhibitors: Pivotal Molecules in Cellular Signalling. *Cell. Signal.* 11:545-554.
- Park IH, Kim MK, Kim SU. 2008. Ursodeoxycholic acid prevents apoptosis of mouse sensory neurons induced by cisplatin by reducing P53 accumulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(4):1025-30.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22(2):153-83.
- Petit P, Bréard J, Montalescot V, El Hadj NB, Levade T, Popoff M, Geny B. 2003. Lethal toxin from *Clostridium sordellii* induces apoptotic cell death by disruption of mitochondrial homeostasis in HL-60 cells. *Cell Microbiol.* 5(11):761-71.
- Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer DK, Aktories K, Barth H. 2003. Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 278(45): 44535–44541.
- Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C, Benito M, Nebreda AR. 2004. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell.* 15(2):922-33.
- Qa'Dan M, Spyres LM, Ballard JD. 2000. pH-induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. *Infect Immun* 68:2470–2474.

Literaturangaben

- Rajesh KG, Suzuki R, Maeda H, Yamamoto M, Yutong X, Sasaguri S. 2005. Hydrophilic bile salt ursodeoxycholic acid protects myocardium against reperfusion injury in a PI3K/Akt dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 39(5):766-76.
- Ramalho RM, Viana RJ, Low WC, Steer CJ, Rodrigues CM. 2008. Bile acids and apoptosis modulation: an emerging role in experimental Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 14(2):54-62.
- Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schrattenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C. 2007. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature.* 446(7134):415-9.
- Rodrigues CM, Sola S, Nan Z, Castro RE, Ribeiro PS, Low WC, Steer CJ. 2003. Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10):6087-92.
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. 1999. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 6(9):842-54.
- Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. 1998. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med.* 4(3):165-78.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* 15(10):2442-51.
- Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(2):320-44.
- Rupnik M. 2008. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev.* 32(3):541-55.
- Rupnik M, Pabst S, Rupnik M, von Eichel-Streiber C, Urlaub H, Söling HD. 2005. Characterization of the cleavage site and function of resulting cleavage fragments after limited proteolysis of *Clostridium difficile* toxin B (TcdB) by host cells. *Microbiology.* 151(Pt 1):199-208.
- Russell DW, Setchell KD. 1992. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry.* 31(20):4737-49.
- Rust C, Wild N, Bernt C, Vennegeerts T, Wimmer R, Beuers U. 2009. Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem.* 284(5):2908-16.
- Sasaki Y, Yamamoto K, Kojima A, Norimatsu M, Tamura Y. 2000. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Res Vet Sci.* 69(3):289-94.
- Schirmer J, Aktories K. 2004. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta.* 1673(1-2):66-74.
- Schmidt A, Hall A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Div* 16 (13): 1587-1609.
- Schmidt M, Voss M, Thiel M, Bauer B, Grannass A, Tapp E, Cool RH, de Gunzburg J, von Eichel-Streiber C, Jakobs KH. 1998. Specific inhibition of phorbol ester-stimulated phospholipase D by *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium difficile* toxin B-1470 in HEK-293 cells. Restoration by Ral GTPases. *J Biol Chem.* 273(13):7413-22.
- Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. 2004. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology.* 39(6):1563-73.
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. 1998. Glucosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins—effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. *Biochemistry* 37: 5296–5304.

Literaturangaben

- Sinave C, Le Templier G, Blouin D, Léveillé F, Deland E. Toxic shock syndrome due to *Clostridium sordellii*: a dramatic postpartum and postabortion disease. *Clin Infect Dis*. 2002 35(11):1441-3.
- Slee EA, Keogh SA, Martin SJ. 2000. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ*. 7(6):556-65.
- Solá S, Aranha MM, Steer CJ, Rodrigues CM. 2007. Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid. *Curr Issues Mol Biol*. 9(2):123-38.
- Solá S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CM. 2005. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 42(4):925-34.
- Solá S, Castro RE, Laires PA, Steer CJ, Rodrigues CM. 2003. Tauroursodeoxycholic acid prevents amyloid-beta peptide-induced neuronal death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathway. *Mol Med*. 9(9-12):226-34.
- Tsuchiya S, Tsuji M, Morio Y, Oguchi K. 2006. Involvement of endoplasmic reticulum in glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett*. 166(2):140-9.
- Vetter IR, Hofmann F, Wohlgemuth S, Herrmann C, Just I. 2000. Structural consequences of mono-glucosylation of Ha-Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin. *J Mol Biol*. 301(5):1091-5.
- Von Eichel-Streiber C, Boquet P, Sauerborn M, Thelestam M. 1996. Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends Microbiol*. 4(10):375-82.
- Von Eichel-Streiber C, Sauerborn M, Kuramitsu HK. 1993. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol* 174: 6707-6710.
- Voth DE, Ballard JD. 2007. Critical intermediate steps in *Clostridium sordellii* lethal toxin-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 30;363(4):959-64.
- Voth DE, Qa'Dan M, Hamm EE, Pelfrey JM, Ballard JD. 2004. *Clostridium sordellii* lethal toxin is maintained in a multimeric protein complex. *Infect Immun*. 72(6):3366-72.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 118(Pt 5):843-6.
- Wittinghofer A, Pai EF. 1991. The structure of *ras* protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci*. 16:382-387.
- Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. 2002. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology*. 36(3):592-601.
- Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. 2001. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 33(3):616-26.
- Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1):47-59.

9. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Dipl. Biochem. Florian Schulz
Geburtsdatum: 03.09.1979
Geburtsort: Salzgitter
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1992-1999 Gymnasium Salzgitter Bad
28.06.1999 Abitur am Gymnasium Salzgitter Bad

Ersatzdienst

08/1999-06/2000 Ersatzdienst im Krankenhaus Einbeck

Akademischer Werdegang

10/2000-06/2007 Studium der Biochemie (Diplom) an der
Leibniz Universität Hannover
04.06.2007 Diplom in Biochemie an der Leibniz Universität Hannover
Gesamtnote „gut“

Titel der Diplomarbeit:
„Die p38-MAP-Kinase vermittelt den RhoB-abhängigen
zytotoxischen Effekt clostridialer glucosylierender Toxine“

Angefertigt unter Anleitung von Prof. I. Just und
PD Dr. H. Genth an dem Institut für Toxikologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Seit 07/2007 Promotion zum Thema:
“Hemmung der durch *Clostridium sordellii* Letales Toxin
induzierten Apoptose mit Tauroursodeoxycholsäure –
Kritische Rolle des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweges”

Angefertigt unter Anleitung von Prof. I. Just und
Prof. Dr. H. Genth an dem Institut für Toxikologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Publikationen

Dreger SC, **Schulz F**, Huelsenbeck J, Gerhard R, Hofmann F, Just I, Genth H: Killing of Rat Basophilic Leukemia Cells by Lethal Toxin from *Clostridium sordellii*: Critical Role of Phosphatidylinositide 3'-OH Kinase/Akt Signaling. *Biochemistry*, 2009, 48 (8): 1785-1792

Schulz F, Just I, Genth H: Prevention of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin-induced apoptotic cell death by Tauroursodeoxycholic Acid. *Biochemistry*, 2009, 48 (38): 9002-9010

Übersichtsartikel

Genth H, **Schulz F**, Just I: Glucosylation of Rho/Ras proteins by Lethal Toxin - implications of actin-reorganization and apoptosis in *C.sordellii*-associated disease. *The Open Toxinology Journal*, 2009: Accepted for publication.

Tagungsbeiträge (inkl. Meeting Abstracts)

Mainz (Germany), 10th – 12th March 2009, 50th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, I. Just, H. Genth.

Title: *C.sordellii* lethal toxin-induced apoptotic cell death is based on inhibition of phosphoinositide-3 kinase/Akt signalling. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 379: p. 24, 91, Suppl. 1 April 2009

Mainz (Germany), 10th – 12th March 2009, 50th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

M. Lica, **F. Schulz**, J. Huelsenbeck, I. Just, H. Genth.

Title: Difference in the cytotoxic effects of Toxin B from *Clostridium difficile* in proliferating and non-proliferating cells. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 379: p. 24, 92, Suppl. 1 April 2009

Freiburg (Germany), 28th February – 1st March 2009, 3rd Schauinsland-Meeting, DFG Priority Program SPP 1150: Signal Pathways to the Cytoskeleton and Bacterial Pathogenesis

F. Schulz

Title: TUDCA prevents the cytotoxic effects of *Clostridium sordellii* lethal toxin

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

J. Huelsenbeck, S.C. Dreger, **F. Schulz**, M. Gaestel, I. Just, G. Fritz, H. Genth.

Title: Upregulation of the immediate-early gene product RhoB by the Ras-glucosylating *Clostridium sordellii* lethal toxin. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 97, Suppl. 1 March 2008

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

M. May, **F. Schulz**, I. Just, H. Genth.

Title: Difference in the formation of multi-nuclei induced by *Clostridium difficile* toxin B from strain VPI10463 and strain 1470. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 98, Suppl. 1 March 2008

Curriculum Vitae

Braunschweig (Germany), 11th December 2008, Helmholtz International Research School for Infection Biology, 2nd International PhD Symposium.

F. Schulz, I. Just, H. Genth

Title: *Clostridium sordellii* lethal toxin induced apoptotic cell death is based on inhibition of the phosphoinositide-3 kinase/Akt signalling.

Goslar (Germany), 28th September – 2nd October 2008, Hannover Biomedical Research School: Summer School "Signaling and Immunity".

F. Schulz, I. Just, H. Genth.

Title: Inactivation of PI 3-kinase is a critical intermediate step in TcsL-induced apoptotic cell death.

Mainz (Germany), 11th – 13th March 2008, 49th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, M. May, I. Just, H. Genth.

Title: Programmed cell death induced by *Clostridium sordellii* lethal toxin in macrophage-like J774A.1 cells. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 377: p. 27, 98, Suppl. 1 March 2008

Mainz (Germany), 13th – 15th March 2007, 48th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, J. Huelsenbeck, R. Gerhard, A. Kotlyarov, G. Fritz, I. Just, H. Genth.

Title: p38 MAP kinase and the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxin B. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 371: p. 38, 149, Suppl. 1 March 2007

Mainz (Germany), 15th – 17th March 2005, 46th Spring Meeting of the German Society of Pharmacology and Toxicology.

F. Schulz, J. Huelsenbeck, I. Just, H. Genth.

Title: The catalytic domain of native large clostridial cytotoxins escapes antitoxin detection. NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 371: p. 117, 491, Suppl. 1 February 2005