Universität Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institutsleitung:

Prof. Dr. Holger Barth* und *Prof. Dr. Peter Gierschik

Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung von Ambroxol auf die Toxine TcdA, TcdB und CDT von *C. difficile*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

2021

Jan Eric Baier

Geboren in Mosbach

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Frick

Tag der Promotion: 21. Juli 2022

(aus Gründen des Datenschutzes entfernt)

Teile dieser Dissertation wurden bereits im folgenden Fachartikel veröffentlicht:

- Heber S, Barthold L, Baier J, Papatheodorou P, Fois G, Frick M, Barth H, Fischer S: Inhibition of Clostridioides difficile Toxins TcdA and TcdB by Ambroxol. Front Pharmacol, 12: 809595 (2021)
  https://doi.org/10.3389/fphar.2021.809595
  https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.809595/full#supplementary-material
  Copyright © 2022 Heber, Barthold, Baier, Papatheodorou, Fois, Frick, Barth and Fischer.
  Open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 International, (CC BY 4.0), https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis V
II. Abkürzungsverzeichnis VII
1 Einleitung 1
1.1 *Clostridioides difficile* Infektion 1
1.2 Bakterielle Toxine 2
1.3 Große clostridiale glykosylierende Toxine (TcdA/TcdB) 4
1.4 *Clostridium difficile* Transferase 7
1.5 CDTb 9
1.6 Ambroxol 10
1.7 Ziele der Arbeit 12
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Verwendete Geräte 14
2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien 15
2.1.3 Verwendete Chemikalien und Substanzen 16
2.1.4 Lösungen und Puffer 17
2.1.5 Verwendete Zelllinien 20
2.1.6 Nährmedium 20
2.1.7 Toxine 21
2.1.8 Inhibitor 21
2.1.9 Antikörper 21
2.1.10 Softwareprogramme 22
2.2 Methoden 22
2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen 22
2.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) 23
2.2.3 Western-Blot 23
2.2.4 Strippen der Nitrocellulosemembran 24
2.2.5 Zytotoxizitätsversuche mit TcdA, TcdB und CDT auf Vero und CaCo-2 Zellen 24
2.2.6 MTS Zellviabilitätsassay 25
2.2.7 Vero Zelllysat herstellen 26
2.2.8 *In vitro* Enzymaktivität von CDTa 26
2.2.9 *In vitro* ADP-Nachribosylierung 26

2.2.10 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes im TEER Assay 27
2.2.11 Detektion von intrazellulärem Rac1 nach Behandlung mit TcdA und TcdB 27
2.2.12 Untersuchung der Bindung von CDTb an Vero Zellen 28
3 Ergebnis 29
3.1 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdA und TcdB 29
3.1.1 Inhibitorischer Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdB 29
3.1.2 Inhibitorischer Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero – Zellen mit TcdA ... 35
3.1.3 Bestimmung der mittleren effektiven Hemmkonzentration von Ax auf TcdA und TcdB 40
3.1.4 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen bei Kombination von TcdA und TcdB 40
3.1.5 Reduktion von glykosyliertem Rac1 durch Ax nach Vergiftung mit TcdA oder TcdB 43
3.2 Inhibitorischer Effekt von Ax auf CDT-vergiftete Zellen 47
3.2.1 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von nicht humanen Vero Zellen mit CDT 47
3.2.2 Einfluss von Ax auf die Vergiftung humaner Dickdarmepithelzellen mit CDT ... 49
3.2.3 Der Effekt von Ax auf die Enzymaktivität von CDTa 53
3.3 Einfluss von Ax auf CDTb und dessen zytotoxischen Eigeneffekt in Zellversuchen .. 55
3.3.1 Effekt von Ax auf die Behandlung von Vero Zellen mit CDTb 55
3.3.2 Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb an Vero Zellen 58
3.4 Ausschluss eines möglichen Eigeneffektes von Ax 59
4 Diskussion 63
5 Zusammenfassung 74
6 Literaturverzeichnis 76
III. Danksagung VIII
IV. Lebenslauf IX

II. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ax-HCL	Ambroxolhydrochlorid
ANS	Atemnotsyndrom
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Ambroxol
C2II	Translokations- und Bindungkomponente des C2-Toxins
C. botulinum	*Clostridium botulinum*
CDAD	*C. difficile* assoziierte Diarrhoe
C. difficile	*Clostridioides difficile* (früher: *Clostridium difficile*)
CDI	*Clostridioides difficile* Infektion
C. diphtheriae	*Corynebacterium diphtheriae*
CDT	*Clostridium difficile* Transferase
CDTa	Enzymatisch aktive Komponente von CDT
CDTb	Translokations- und Bindungkomponente von CDT
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CROPs	repetitive Oligopeptidsequenzen (engl. *combined repetitive oligopeptides*)
CSPG4	*chondroitin sulfate proteoglycan 4*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Diphtherietoxin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	*flow sorter*; *fluorescence-activated cell sorting*
FCS	Fötales Kälberserum
FZD	*Frizzled*
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GEFs	GTP-Austaschfaktoren (engl. *Guanosine triphosphate exchange factors*)
GIT	Gastrointestinaltrakt

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gp96	Glykoprotein 96
HCL	Hydrochlorid
Ia	Enzymatisch aktive Komponente des Iota-Toxins
Ib	Translokations- und Bindungkomponente des Iota-Toxins
IL-8	Interleukin-8
ILDRs	*immunoglobulin-like domain-containing receptors*
LBs	*lamellar bodies*
LPS	Lipopolysaccharide
LSR	*lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*
LT B4	Leukotrien B4
M. Gaucher	Morbus Gaucher
MHC-II	*major histocompatibility complex – class 2*
M. Parkinson	Morbus Parkinson
MTX	Methotrexat
NHE3	*Na^+/H^+ exchanger 3*
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween® 20
PFA	Paraformaldehyd
PFT	Porenbildende Toxine (engl. *pore-forming toxins*)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SD	Standardabweichungen
S. pyogenes	*Streptococcus pyogenes*
Strep-POD	Streptavidin—Peroxidase
TcdA	Toxin A von *C. difficile*
TcdB	Toxin B von *C. difficile*
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
v-ATPase	H^+-ATPase vom vakuolären Typ

1 Einleitung

Infektionskrankheiten durch pathogene Bakterien sind auch heute noch eine der häufigsten Todesursachen weltweit [169]. In Deutschland spielt vor allem die Zunahme an nosokomialen Infektionen im Krankenhaus eine große Rolle [53]. Eine der häufigsten nosokomialen Infektionen stellt die *Clostridioides difficile* Infektion (CDI) dar [53, 102].

1.1 *Clostridioides difficile* Infektion

Clostridioides (C.) difficile (früher: *Clostridium difficile*) ist ein grampositives, sporenbildendes, anaerobes Stäbchenbakterium und einer der häufigsten Auslöser von nosokomialen Antibiotika—assoziierten Diarrhoen [97, 102, 13]. Ein Grund für die nosokomiale Ausbreitung ist die asymptomatische Besiedlung mit *C. difficile* von Personal und Patienten, die dann als weitere Überträger agieren [140]. Der Hauptrisikofaktor für eine CDI ist die Antibiotikagabe [24, 13, 82]. Insbesondere häufig eingesetzte Antibiotika wie Cephalosporine oder Clindamycin bewirken eine Veränderung der normalen Darmflora, die es *C. difficile* erlaubt, sich im Darm auszubreiten [153, 143].

Eine Zunahme der Fälle und Schwere von CDI ist weltweit zu beobachten [101, 116]. Dabei spielt der zunehmende Gebrauch von Antibiotika sowie die Zunahme von hypervirulenten Stämmen eine Rolle [175, 44]. So zeichnet sich der hypervirulente Stamm NAP1/B1/027, der mittlerweile auch ein Großteil der CDI in Deutschland ausmacht, durch eine erhöhte Morbidität, Mortalität und eine erhöhte Rückfallrate aus [116, 44, 65]. Diese wird durch eine 16-fach erhöhte Produktion von Toxin A (TcdA) und eine 23-fach erhöhte Produktion an Toxin B (TcdB) im Vergleich zu dem Kontrollstamm erreicht [165, 137]. Zudem produziert NAP1/B1/027 ein drittes Toxin, das in die Klasse der binären ADP-ribosylierenden Toxine fällt und als *Clostridium difficile* Toxin (CDT) bezeichnet wird [55, 65]. Weiterhin zeigt sich eine Zunahme multiresistenter *C. difficile* Stämme, die eine Behandlung mit den Erstlinientherapeutika erschweren [130]. Diese erschwerten Behandlungsbedingungen führen zu einer verlängerten Liegedauer, bei der ein besonderes Hygienekonzept und Management in den Krankenhäusern benötigt wird. Als Folge der Zunahme an Häufigkeit und schwereren CDIs steigen die Kosten für die Behandlung der erkrankten Patienten an [103, 163].

Die klinischen Symptome einer CDI können von einer leichten Diarrhoe bis hin zu schwerwiegenden und lebensbedrohlichen Erkrankungen wie der Pseudomembranösen Kolitis und der Ausbildung eines toxischen Megakolons reichen. Die Einleitung einer adäquaten antibiotischen Therapie bei einer *C. difficile* assoziierten Diarrhoe (CDAD) ist von großer Bedeutung, um Komplikationen und das Fortschreiten der Infektion zu verhindern. Die Standarttherapie besteht in der Gabe von Antibiotika wie Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomicin, die gegen das Bakterium wirken [67, 5, 102]. Allerdings werden die klinischen Symptome durch die bakteriellen Toxine ausgelöst, die in das Darmlumen sezerniert werden und nicht von der Antibiotikatherapie erfasst werden. Die Toxine führen zu einer Beeinträchtigung und Auflösung der Darmbarriere, was zu blutig-wässrigen Diarrhoen, Entzündung mit Fieber und abdominalen Schmerzen führt. *C. difficile* Stämme, die keine Toxine produzieren, führen auch zu keiner Erkrankung [50, 93, 94]. Durch den zunehmenden Antibiotikagebrauch bei gleichzeitigem Anstieg an Resistenzen und Virulenzen in *C. difficile* Stämmen braucht es alternative bzw. ergänzende Strategien zur Bekämpfung von CDIs.

1.2 Bakterielle Toxine

Bakterielle Toxine können aufgeteilt werden in Endotoxine und Exotoxine. Endotoxine sind Bestandteile der äußeren bakteriellen Membran und auch bekannt als Lipopolysaccharide (LPS). Sie werden nicht aktiv sezerniert, sondern werden nach dem Zerfall von gram-negativen Bakterien frei und können toxisch wirken, indem sie immunkompetente Zellen aktivieren und so eine pro-inflammatorische Immunantwort vermitteln. Dies kann in hohen Konzentrationen bis hin zu einer Sepsis mit letalem Ausgang führen [135, 136, 18]. Exotoxine sind dagegen Toxine, die aktiv von lebenden Bakterien freigesetzt werden. Man kann aufgrund der Wirkungsweise drei Klassen unterscheiden: Superantigene, porenbildende Toxine (PFT) und AB-Toxine.

Superantigene vermitteln ihre toxische Wirkung über eine massive, unspezifische Aktivierung des adaptiven Immunsystems und werden unter anderem von *Staphylococcus* (*S.*) *aureus und Streptococcus* (*S.*) *pyogenes* gebildet [23]. Superantigene können ohne Prozessierung direkt an den äußeren Teil von *major histocompatibility complex – class 2* (MHC-II) Molekülen binden und dann mit dem T-Zell Rezeptor von CD4+ T-Zellen interagieren. Eine massive, unspezifische Immunantwort ist die Folge, durch die es zu einer Schwächung des Immunsystems kommt [75, 136].

Eine weitere Klasse, die PFTs, vermitteln ihre Wirkung durch Porenbildung in der Membran ihrer Zielzelle. Dadurch kann es zum Ein- oder Ausstrom von Ionen, kleinen Molekülen wie ATP und/oder ganzen Proteinen kommen. Auf Grund der Heterogenität der PFTs kann die jeweilige Veränderung der Zellhomöostase von reversiblen bis zu letalen Zellschäden führen. Vertreter der PFTs können eingeteilt werden in α-PFTs (z.B. Colchicin A von *Escherichia (E.) coli*) und β-PFTs (z.B. α-Toxin von *S. aureus*) [33, 20].

Weiter gibt es noch die Gruppe der AB-Toxine, die ihre Wirkung über die Modifikation eines spezifischen Substrates im Zellinnern vermitteln. AB-Toxine bestehen aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen. Die enzymatisch aktive A-Domäne katalysiert die intrazelluläre Substratmodifizierung. Die B-Domäne ist für Bindung, Aufnahme in die Zelle und Translokation der A-Domäne in das Zytosol verantwortlich. AB-Toxine können als einkettige (*single-strain*) Toxine oder als binäre Toxine vorliegen [12]. Ein Prototyp für die einkettigen Toxine stellt das Diphtherie-Toxin (DT) von *Corynebacterium* (*C.*) *diphtheriae* dar [32]. TcdA und TcdB von *C. difficile* stellen ebenfalls einkettige Toxine dar und gehören allerdings zu den großen clostridialen glykosylierenden Toxinen [81]. Binäre AB-Toxine zeichnen sich durch zwei getrennte, nicht verbundene Komponenten aus. Um die spezifischen zytotoxischen Effekte auszulösen, werden beide Komponenten benötigt [12]. Bei den binären AB-Toxinen stellt das C2-Toxin von *Clostridium* (*C.*) *botulinum* den Prototyp dar [1]. Dabei teilt es, aufgrund des ähnlichen strukturellen Aufbaus, viele seiner Eigenschaften mit dem Iota-Toxin von *C. perfringens* und CDT von *C. difficile* [12]. So vermitteln die drei Toxine ihre zytotoxische Wirkung über eine ADP-Ribosylierung von G-Aktin mit anschließender Zerstörung des Aktinzytoskeletts [1, 144, 55].

AB-Toxine teilen sich unabhängig von der Klassenzugehörigkeit einige Gemeinsamkeiten [88]. So kommt es nach der Rezeptorbindung zu einer Rezeptor-vermittelten endozytotischen Aufnahme in frühe Endosomen [16, 66, 10]. Eine Ansäuerung mittels einer H^+-ATPase vom vakuolären Typ (v-ATPase) führt zu Strukturänderung im Toxin und einer Porenbildung in der endosomalen Membran durch die B-Domäne, was die Translokation der A-Domäne in das Zytosol ermöglicht [16, 10]. Im Zytosol verursacht die A-Domäne durch spezifische Substratmodifikation zelluläre Effekte, welche klinische Symptome hervorrufen kann, die mit dem Toxin und dem toxin-produzierenden Bakterium assoziiert werden.

1.3 Große clostridiale glykosylierende Toxine (TcdA/TcdB)

Eine Gruppe der AB-Toxine stellen die großen clostridialen glykosylierenden Toxine dar. Diese haben als Gemeinsamkeiten einen ähnlichen strukturellen Aufbau sowie die Fähigkeit, Rho Proteine zu glykosylieren [3]. Die einkettigen Toxine TcdA und TcdB von *C. difficile* stellen zwei Vertreter dieser Klasse da. TcdA und TcdB gleichen sich in ihrer Aminosäuresequenz zu 63% [162]. Beide Toxine sind in der Lage, eine Erkrankung hervorzurufen und stellen die Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* dar, wobei die Rollenverteilung beider Toxine während der Infektion weiter diskutiert wird. Es scheint jedoch, als wäre TcdB der virulente Faktor und hauptsächliche für schwere Schäden an Mukosa und Darm verantwortlich [26, 93]. Der Aufbau beider Toxine wird mit dem ABCD-Modell dargestellt, bei dem die Toxine in vier funktionelle Domänen eingeteilt werden (siehe Abbidlung 1). Am N-terminalen Ende angefangen, befindet sich die enzymatisch aktive A-Domäne, in der die Glykosyltransferase beheimatet ist. Die B-Domäne, die die Bindungs- und Transportdomänen enthält, befindet sich am C-terminalen Ende. Auf der C-Domäne ist eine Autoprotease lokalisiert und folgt auf die A-Domäne. Die D-Domäne ist bei der Translokation ins Zytosol beteiligt und besitzt Sequenzen mit hydrophoben Eigenschaften [81, 3].

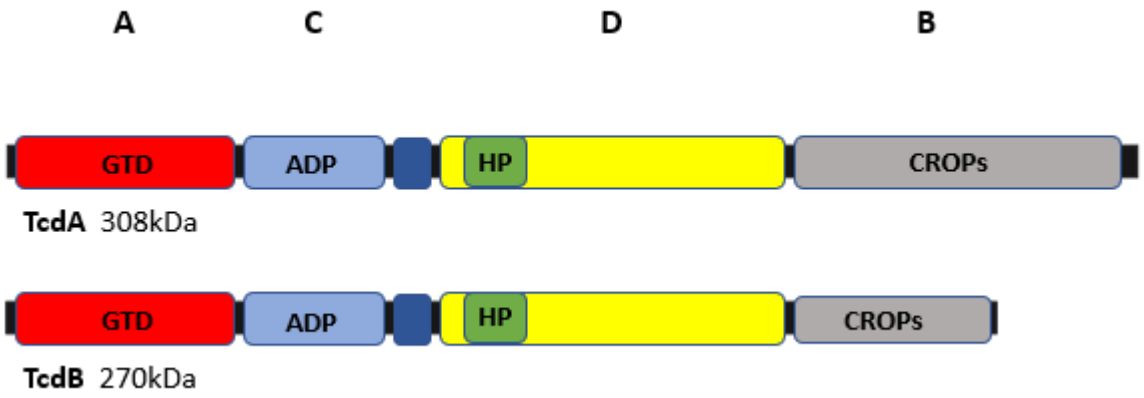


Abbildung 1: Schematische Darstellung von TcdA und TcdB nach ABCD-Modell

TcdA (308 kDa) und TcdB (270 kDa) bestehen aus vier Domänen. Die A-Domäne (rot) befindet sich am N-terminalen Ende und enthält die Glycosyltransferase. Die B-Domäne (grau) am C-terminalen Ende besteht aus repetitiven Oligopeptidsequenzen (engl., *combined repetitive oligopeptides*, CROPs) und spielt eine Rolle bei der Rezeptorbindung. Die C-Domäne (blau) enthält eine Autoprotease und ist über drei α-Helices (dunkelblau) mit der D-Domäne verbunden. Die D-Domäne (gelb) enthält Hydrophobe Sequenzen (HP), die bei der Translokation in das Zytosol involviert sind. Die Abbildung basiert auf [81].

Der B-Domäne von TcdA und TcdB enthält repetitive Peptidsequenzen (*combined repetitive oligopeptides*, CROPs), die für die Rezeptorbindung verantwortlich sind [51]. Jedoch unterscheiden sich diese bei TcdA und TcdB leicht voneinander und stehen im Einklang mit

der Entdeckung, dass die Toxine an unterschiedliche Rezeptoren binden [29]. Der funktionelle Rezeptor von TcdA ist noch immer nicht bekannt, doch verschiedene Kohlenhydratstrukturen wie GalNAc-(1,3)-β-Gal-(1,4)-β-GlcNAc und Glykoprotein 96 (gp96) konnten identifiziert werden, die eine Rolle bei der Bindung spielen [121, 95, 158, 31]. Für Toxin B konnten *chondroitin sulfate proteoglycan 4* (CSPG4) und *Frizzeled* (FZD), welcher ein Rezeptor im *Wnt* Signalweg ist, als zwei Rezeptoren ausgemacht werden, die bei Bindung und Aufnahme von TcdB in die Zelle involviert sind [157, 174]. Die Aufnahme von TcdA und TcdB wird in Abbildung 2 dargestellt.

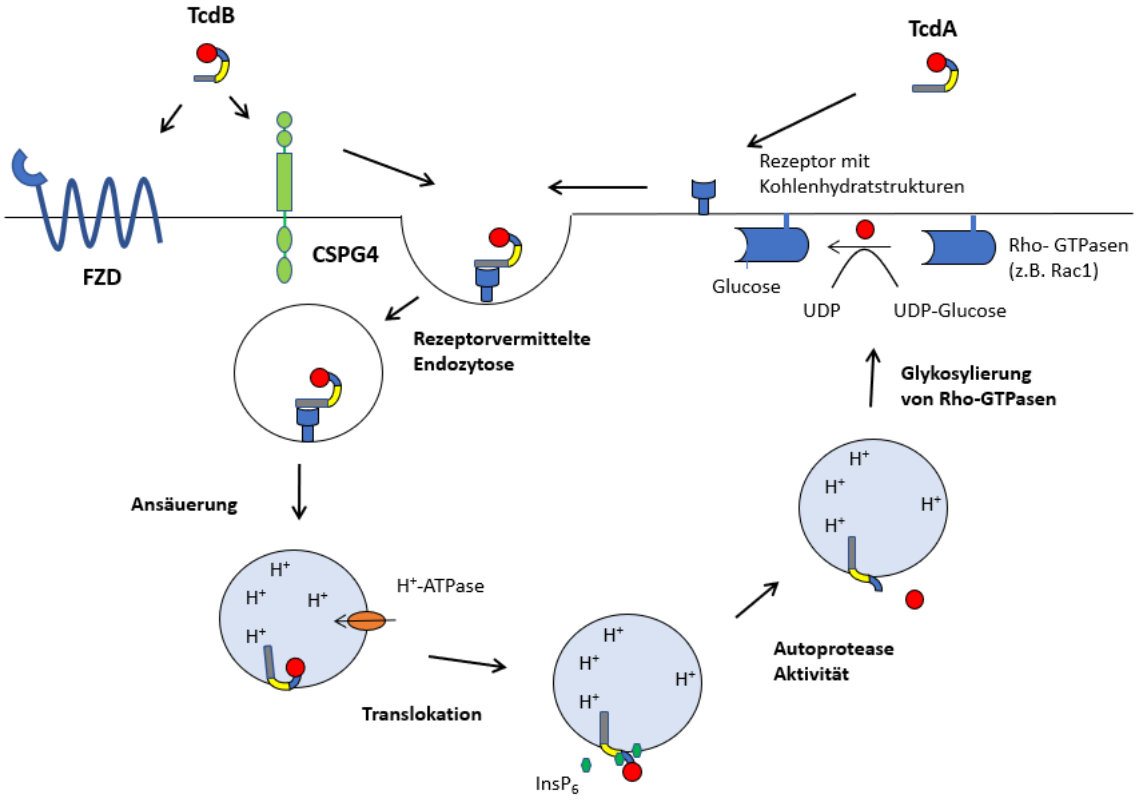


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von TcdA und TcdB

TcdA bindet an Kohlenhydratstrukturen. TcdB bindet an *chondroitin sulfate proteoglycan 4* (CSPG4) und *Frizzeled* (FZD). Durch die Bindung kommt es zu einer durch Endozytose vermittelten Aufnahme in die Zelle. Durch Ansäuerung des Milieus im Endosom kommt es zur Einlagerung in Membran mit Translokation der Autoprotease-Domäne sowie der Glykosyltransferase. Inositol Hexakisphosphat ($InsP_6$) bewirkt die Aktivierung der Autoprotease-Domäne mit Freisetzung der Glykosyltransferase. Die Glykosyltransferase beginnt mit der Glykosylierung von membranständigen Rho Proteinen wie RhoA, Rac und cdc42. UDP-Glukose wirkt dabei als Substrat für die Glykosyltransferase. Durch glykosylierte Rho Proteine kommt es zu pathologischen Effekten in der Zelle. Die Abbildung basiert auf [81].

Bei beiden Toxinen findet die Aufnahme über eine Dynamin-abhängige Endozytose statt [128]. Während die Aufnahme bei TcdB Clathrin-vermittelt ist, zeigt TcdA eine Clathrin-unabhägige, PACSIN2-/dynamin-abhängige Endozytose [57, 28]. Als weiteren Schritt zur Translokation der Toxine ins Zytosol kommt es zur Ansäuerung des Milieus im Endosom [134]. Es konnte gezeigt

werden, dass eine pH-Minderung <5,6 für die Translokation notwendig ist [62, 3, 11]. Eine Inhibition der v-ATPase durch Bafilomycin A verhindert die Translokation ins Zytosol und hemmt die Zytotoxizität der Toxine [11]. Für die Translokation der Autoprotease Domäne und der Glykosyltransferase in das Zytosol ist die Ansäuerung somit ein essenzieller Schritt. Durch das Einfügen der hydrophoben Anteile der D-Domäne der Toxine kommt es zu einem Einbau in die endosomale Zellmembran mit anschließender Translokation in das Zytosol [36, 9]. Die weitere Aktivierung im Zytosol wird über eine Bindung von zytosolischem Inositol Hexakisphosphat (InsP6) an die Autoprotease Domäne vermittelt. Dadurch wird die enzymatisch aktive Glykosyltransferase im Zytosol freigesetzt [35, 138]. Die freigewordene enzymatische Glykosyltransferase beginnt daraufhin mit der Glykosylierung membranständiger Proteine wie Rac, Cdc42 sowie Rho A,B und C [85, 84]. Diese sind Rho Proteine, die zur Ras Super-Familie gehören und als membranständige GTPasen für verschiedenste Prozesse in der Zelle verantwortlich sind. Dazu gehört u.a. die Regulation des Zytoskeletts und von Bewegungsprozessen wie Migration, Phagozytose und intrazelluläre Transportwege [25]. Weiterhin sind die Rho Proteine an der Regulation von Transkription, Zellzyklus und Apoptose beteiligt [80]. Durch die Glykosylierung mit intrazellulärer UDP-Glucose werden diese wichtigen zellulären Prozesse gehemmt, da durch die Glykosylierung eine Inaktivierung der Rho Proteine erfolgt [85, 84]. Dies geschieht zum einen dadurch, dass GTP-Austauschfaktoren (*Guanosine triphosphate Exchange Factors*, GEFs) nicht länger mit den Rho-GTPasen interagieren können und diese in einem inaktiven Zustand verbleiben [150]. Zusätzlich kommt es auch zu einer sterischen Hemmung der Rho-GTPasen, ausgelöst durch den Einbau des Glucoserests an Threonin 35 (bei RhoA) oder Threonin 37 (bei cdc42 und Rac) [84]. Ebenfalls wird die weitere Signalvermittlung im Zytosol durch die Glykosylierung der Rho Proteine gestört [54]. All dies führt zur Unterbrechung wichtiger Signalstrukturen in der Zelle und zu Änderungen in der Regulation des Zytoskeletts und der durch Aktin vermittelten Zell-Zell-Kontakte [109, 117]. Im Lichtmikroskop lassen sich diese Effekte durch morphologische Veränderung der vergifteten Zellen beobachten. Durch den Verlust von Zell-Zell Kontakten und der Dysregulation im Aktin—Zytoskelett kommt es zu einer Schrumpfung der Zelle mit Neuriten-artigen Ausläufern, die in eine Abrundung der Zelle übergehen [45, 126]. Die Apoptose der Zellen wird allerdings nicht über die Änderung im Aktin—Zytoskelett eingeleitet, sondern über die Aktivierung von Caspasen (Caspase 3, 8, und 9) und Induktion von Entzündungsmediatoren [56, 105, 3].

1.4 *Clostridium difficile* Transferase

Die *Clostridium difficile* Transferase (CDT) ist ein binäres ADP-ribosylierendes Toxin, das von hypervirulenten *C. difficile* Stämmen wie NAP/B1/027 gebildet wird [55, 133]. Es bewirkt durch eine ADP-Ribosylierung von G-Aktin eine Unterbrechung der Polymerbildung von F-Aktin und führt zum Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts [3]. Dass *C. difficile* Stämme ein weiteres Toxin produzieren, konnte erstmalig 1988 gezeigt werden [133]. Seitdem nehmen hypervirulente Stämme zu, die u.a. CDT produzieren und für erhöhte Mortalität und Morbidität verantwortlich sind [165, 44]. CDT weist Ähnlichkeiten mit anderen binären ADP-ribosylierenden Toxinen, wie dem C2-Toxin und dem Iota-Toxin, auf [12, 133, 55, 144]. CDT besteht aus zwei getrennten und nicht verbundenen Komponenten, die zusammen eine Erkrankung auslösen [12, 60]. CDTa ist die enzymatische A-Komponente und hat eine molekulare Masse von 48 kDa. Am C-terminalen Ende befindet sich die ADP-Ribosyltransferase. Der am N-Terminus beheimatete Abschnitt interagiert mit CDTb. CDTb ist die Bindungskomponente, hat eine molekulare Masse von 98.8 kDa und besteht aus vier Domänen. Domäne 1 ist zuständig für die (proteolytische) Aktivierung und Domäne 2 ist bei der Einlagerung und Porenbildung in der Membran beteiligt. Domäne 3 ist für die Heptamerisierung zuständig und Domäne 4 bindet an den Rezeptor der Zelle [12]. Durch proteolytische Spaltung innerhalb der Domäne 1 wird entsteht die aktive Form von CDTb. Erst danach sind die weiteren Prozesse zur Zusammenlagerung und Oligomerisierung möglich [12, 60, 154]. Der Aufnahmemechanismus von CDT wird in Abbildung 3 dargestellt.

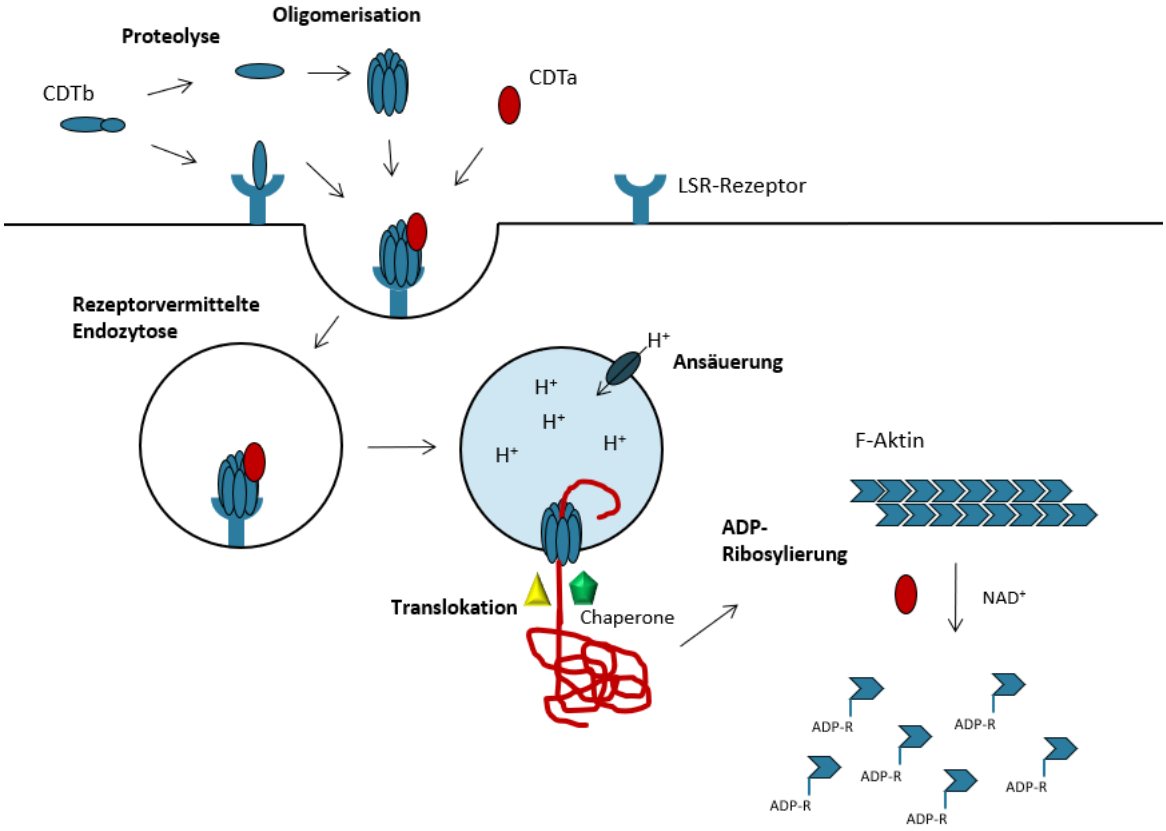


Abbildung 3: Schematische Darstellung des zellulären Aufnahmemechanismus von CDT

CDTb wird durch proteolytische Spaltung aktiviert. Durch Zusammenlagerung entsteht ein Heptamer, an den sich die enzymatische CDTa Komponente anlagert. Nach Bindung an den *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor* (LSR) wird der Toxin-Komplex via Rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen in die Zelle. Durch Ansäuerung über eine v-ATPase wird der pH gesenkt und es kommt zu einer Konformationsänderung der CDT-Komponenten. Der CDTb-Komplex bildet eine Pore in der Membran, durch die die enzymatische CDTa Komponente ungefaltet durchtreten kann. Im Zytosol helfen zelleigene Chaperone bei der Rückfaltung. Anschließend wird durch die enzymatische ADP-Ribosyltransferase ADP-Ribosereste auf G-Aktin an der Stelle Arg177 übertragen. Dies bewirkt die Unterbrechung der Polymerisierung von Aktin. Die Abbildung basiert auf [12, 55].

CDT bindet an den Lipolyse-stimulierenden Lipoproteinrezeptor (*lipolysis-stimulated lipoprotein receptor*, LSR) [129]. Dieser gehört zu der Familie der *immunoglobulin-like domain-containing receptors* (ILDRs) und ist beteiligt bei der Ausbildung von trizellulären *tight junctions* mit Hilfe von Tricllulin [79, 108]. Zudem bewirkt er eine LDL-Rezeptor unabhängige Aufnahme von LDL und ist im Lipidstoffwechsel aktiv [173]. Eine Expression findet sich in Leber, Darm, Niere und vielen weiteren Geweben, wobei CD44 als Co-Rezeptor wirkt [170]. Nach Bindung der aktivierten CDTb-Komponente an LSR mit Oligomerisierung kommt es zur Akkumulation in Lipid Rafts auf der Zelloberfläche und CDTa bindet an den CDTb-Komplex [74, 129]. Die Aufnahme erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose und durch Ansäuerung des Milieus im Endosom kommt es zu Konformationsänderungen beider Komponenten. Wie bei anderen binären Toxinen z.B. dem Anthrax-Toxin kommt es bei CDT zur Verschmelzung mit

der endosomalen Membran und zur Bildung eines *14-strand transmembrane β-Barral*, der als Kanal und Durchtrittspunkt für die enzymatische CDTa-Komponente dient [55, 91, 90]. Für die Translokation ins Zytosol muss sich die enzymatische CDTa-Komponente auffalten und im Zytosol wieder rückfalten [71]. Bei der Rückfaltung sind zelleigene Hilfsproteine und Chaperone beteiligt, von denen einige in der AG Barth identifiziert und charakterisiert wurden. Dazu zählen u. a. *Hsp90*, *Hsp70*, *Cyclophilin 40*, *FK-506 binding protein 51 [39, 41, 40, 72, 86]*. Nach der Rückfaltung im Zytosol kann CDTa durch seine ADP-Ribosyltransferase ein ADP-Riboserest auf monomeres G-Aktin an der Stelle Arg177 übertragen [68, 161]. Dabei wirkt zytosolisches NAD^+ als Co-Substrat. ADP-ribosyliertes Aktin wirkt als *„capping"*-Protein am schnell polymerisierenden Ende und verhindert die weitere Polymerisierung von Aktin [167]. Durch den dynamischen Aktin Umbauprozess in der Zelle kommt es zum vollständigen Abbau des Aktin Zytoskeletts [2]. Daraus resultieren Änderungen in der Zellmorphologie sowie Verlust der Barrierefunktion in Epithelzellen [139, 2]. Darüber hinaus kommt es zu Veränderungen in verschiedensten zellulären Prozessen darunter auch Prozesse für Motilität, Stabilität, Sekretion, Phagozytose und viele weitere. Eine weitere Veränderung ist die Bildung von Mikrotubuli-basierten Ausläufern nach der Vergiftung mit CDT [148]. Normalerweise wird das Wachstum der Mikrotubuli durch die Aktinfilamente am Rande der Zelle gestoppt. Durch die Depolymerisation von Aktin und Unterwanderung weiterer regulatorischer Mechanismen wird das weitere Wachstum nicht gehemmt [124]. Die Ausläufer der Mikrotubuli formen ein dichtes Netzwerk auf der Oberfläche von Darmzellen, was bewirkt, dass die Adhärenz von *C. difficile* im Darm erhöht ist [149, 148].

1.5 CDTb

Es wurde davon ausgegangen, dass binäre ADP-ribosylierende Toxine wie CDT, C2 oder das Iota-Toxin beide Komponenten brauchen, um eine Vergiftung hervorzurufen [12, 60]. Jedoch konnte 2011 für die Bindungs- und Translokationskomponente des Iota-Toxins (Ib) ein eigener, zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden [120]. Es wird vermutet, dass dieser durch ionenpermeable Poren in der Zellmembran entsteht, was Einfluss auf die Zellintegrität hat [119, 120]. Auf Grund der Ähnlichkeit von Iota-Toxin zu CDT wurde ein ähnlicher Effekt für CDTb angenommen. Die AG Barth konnte einen eigenständigen zytotoxischen Effekt auch für CDTb zeigen [141, 123]. Dieser zytotoxische Effekt erwies sich als konzentrationsabhängig. Bei niedrigen Konzentrationen bildeten sich die morphologischen Veränderungen wieder zurück,

während der Effekt bei hohen Konzentrationen irreversibel war [141]. Auch konnten verschiedene Inhibitoren wie das Cyclodextrin AMBnTβ, Chloroquin, Fluphenazin und Azolopyridinium-Salze (HA1383, HA1495 und HA1568) ausgemacht werden. Diese zeigten alle Eigenschaften als Porenblocker und konnten den zytotoxischen CDTb-Eigeneffekt inhibieren [123].

1.6 Ambroxol

Das Arzneimittel Ambroxol (Ax) zählt zu den Expektoranzien und ist seit den 1960er-Jahren auf dem Markt. Dabei fällt es unter die Kategorie der Sekretolytika, welche die Bildung von dünnflüssigem Bronchialschleim fördern. Ax ist der wirksamere Metabolit von Bromhexin, welches ebenfalls als Expektorans zugelassen ist. Als natürliche Leitsubstanz dient Vasicin, ein Stoff, der in der indischen Ayurvedamedizin verwendet wird. Eingesetzt wird Ax in seiner Salzform als Ax-hydrochlorid (Ax-HCL), bei akuten und chronischen bronchopulmonalen Erkrankungen mit einer abnormalen Schleimsekretion und gestörtem Schleimtransport sowie zur Hustenlinderung und bei Halsschmerzen. Nach oraler Aufnahme wird Ax schnell und fast vollständig über den Darm aufgenommen [70, 106]. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme liegt bei 80% [106]. Ax entfaltet seine Wirkung als Expektorans in der Lunge. Dies ist nicht verwunderlich, da ein Lungentropismus mit 17-fach erhöhten Ax-Konzentrationen in der Lunge im Vergleich zum Plasma beobachtet werden konnte [114, 106].

Der Hustenreiz wird durch eine Entzündung mit Reizung von Chemorezeptoren und Nozizeptoren hervorgerufen. Ax zeigt dabei eine Hemmung von Na^+-Kanälen von sensorischen Neuronen im Rachenraum, ähnlich wie Lokalanästhetika, was eine anästhetische und damit schmerzlindernde Wirkung hat [168, 100]. Dies wurde auch in klinischen Studien bei Halsschmerzen beobachtet [147, 46]. Dabei konnte gezeigt werden, dass 20 mg Ax einen anästhetischen Effekt im Rachenraum hatten. Eine Steigerung auf 30 mg hatte im Vergleich dazu keinen weiteren positiven Effekte [46]. Außerdem konnte bei einer akuten Pharyngitis eine Reduktion der Halsrötung beobachtet werden, was zusätzlich auf den antientzündlichen Effekt von Ax zurückzuführen war [113].

In Studien wurde eine Normalisierung der Schleimproduktion durch Ax beschrieben. So senkten 120 mg Ax pro Tag die Viskosität des Schleims, stimulierten die Sekretion und erleichterten das Abhusten [58]. Ax beeinflusst verschiedene Ionenkanäle an der apikalen und basolateralen Seite der brochopulmonalen Epithelzellen [160, 159, 156]. Diese produzieren

über die Sekretion von Cl^--Ionen eine dünnflüssige wässrige Solphase, die ein Absinken des mukösen Schleims und eine damit verbundene Einschränkung der mukoziliäre Clearance verhindert. Ax interagiert mit den dafür zuständigen Kanälen und inhibiert den epithelialen Na^+-Kanal (ENaC), was eine Zunahme des Wasseranteils bewirkt [27, 156]. Zusätzlich werden durch Ax die Surfactentproduktion und -sekretion gesteigert [52]. Dabei konnte ein Erhöhung des Surfactant-spezifischen Proteins SP-B in Rattenlungen nachgewiesen werden [151]. Dieser Effekt basiert wahrscheinlich auf einer Änderung des pH-Wertes mit einer Freisetzung von Ca^+ aus intrazellulären Speichern, was eine verehrte Sekretion von Surfactant aus pulmonalen Typ II Zellen nach sich zieht [49]. Dabei ist vor allem der basische Charakter (pKa = 8) mit lipophilen Anteilen (logP = 2) von Ax von Bedeutung [112, 49]. Dieser Effekt scheint für eine Neutralisierung und Pufferung des pHs in den sauren und Ca^+-reichen *lamellar bodies* (LBs) zu sorgen [49]. Die Strukturformel von Ax wird in Abbildung 4 dargestellt.

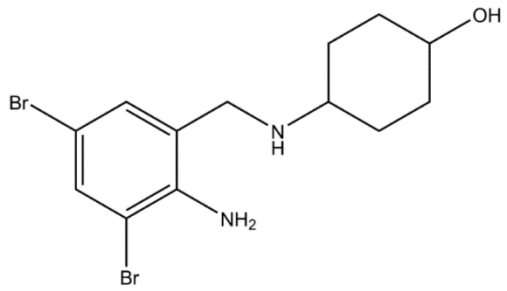


Abbildung 4: Strukturformal von Ax
Ax weist einen basischen Charakter (pKa = 8) mit lipophilen Anteilen (logP = 2) auf und hat ein amphiphiles Verhalten. Die Abbildung basiert auf [112].

Eine weitere Eigenschaft von Ax ist seine antientzündliche und antioxidative Wirkung [14, 19]. Dabei kann Ax die Ausschüttung verschiedener wichtiger Entzündungsmediatoren wie Interleukin 8 (IL-8), Histamine und Leukotrien B4 (LT B4) verringern [17, 59]. Dadurch kommt es unter anderem zu einer Reduktion von Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), hypochloriger Säure (HOCl) und Stickstoffmonoxid (NO) in IL-1-aktivierten Phagozyten sowie zur Reduktion in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikalen (ROS), die bei der Entzündungsantwort produziert und ausgeschüttet werden [64, 127, 98]. Dies bewirkt eine Verringerung des oxidativen Stresses in der Lunge. Diese Effekte scheinen vor allem bei der Verringerung von Exazerbationen bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) hilfreich [132, 43, 125].

Weitere Einsatzmöglichkeiten umfassen unter anderem der Einsatz beim Atemnotsyndrom des Neugeborenen (ANS), das auch als Surfactant-Mangelsyndrom bezeichnet wird. So konnte

im Vergleich zu einer Placebogruppe eine Reduktion im Auftreten eines ANS gezeigt werden [96, 107]. Eine Überlegenheit zu Glucocorticoiden konnte allerdings nicht gezeigt werden [76]. Bei Erwachsenen wurde ein positiver Effekt von Ax auf die pulmonale Leistungsfähigkeit postoperativ nach kardialer OP oder Lungenresektion festgestellt [164, 142].

Durch seine Eigenschaften, seines Nebenwirkungsprofiles und damit verbundener langjährigen, sicheren Anwendung werden weitere Einsatzmöglichkeiten von Ax untersucht. Ein zentraler Forschungsschwerpunkt von Ax liegt in der Erforschung zur Anwendung bei Morbus (M.) Parkinson und Morbus (M.) Gaucher [4, 104]. Dabei scheint Ax als Chaperon eine unterstützende Wirkung beim Falten von mutierter Glucocerebrosidase im endoplasmatischen Retikulum sowie beim Transport zu Lysosomen zu haben [15]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ax die Aktivität der Glucocerebrosidase erhöht und eine Verbesserung der lysosomalen Autophagozytose erreicht wird [110, 115, 30]. In ersten Studien konnte schon eine Verbesserung der Symptome von Parkinson Patienten mit Ax gezeigt werden [118]. Weitere relevante Studien für eine klinische Zulassung stehen vor der Veröffentlichung [152].

Ein antiviraler Effekt konnte bei Influenza-infizierten Ratten nachgewiesen werden. Obwohl Ax teilweise negative Auswirkungen auf das Immunsystem hatte durch Reduktion von Zytokinen, TNF-α und weiteren proinflammatorischen Molekülen, konnte durch eine Ax-bedingte Erhöhung von Faktoren, die die Virusreplikation vermindern, ein vermehrtes Überleben von Mäusen gezeigt werden [172]. Durch seine antiinflammatorischen und antiviralen Effekte sowie seine intrazellulären lysosomalen Eigenschaften wurde ein Einsatz von Ax auch bei der COVID-19 Pandemie diskutiert [30]. Ähnlich wie bei Toxinen sollte hierbei die Ansäuerung im Endosom unterbrochen werden und eine Aufnahme in die Zelle verhindert werden. Andere lysomotropische Substanzen wie Chloroquin konnten erfolgreich bei ADP-ribosylierenden Substanzen als Inhibitoren eingesetzt werden [7, 92]. Seine Eigenschaften als schwache Base und der Einfluss auf sekretorische Lysosomen macht Ax zu einem interessanten Ansatz gegen CDI und im Speziellen gegen die Toxine von *C. difficile*.

1.7 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurde das schon zugelassene Medikament Ax eingesetzt, um den Effekt auf die drei *C. difficile*-Toxine TcdA, TcDB und CDT zu untersuchen. Der Effekt von Ax auf TcdA, TcdB und CDT sollte zunächst durch Zytotoxizitätsversuche an Vero Zellen und CaCo-2 Zellen untersucht werden. Dabei wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen beurteilt, ausgewertet und verglichen. Eine leicht zu beurteilende und etablierte Zelllinie stellten dabei Vero Zellen dar. Weiterhin wurden CaCo-2 Zellen verwendet, da sie als humane Dickdarmepithelzellen die Zielzellen der Toxine von *C. difficile* sind. Auf zellulärer Ebene sollte

der Effekt von Ax auf die Substratmodifikationen der Toxine untersucht werden. Bei TcdA und TcdB wurde dazu Rac1 und bei CDT der ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin untersucht. Ziel war es die Konzentrationsabhängigkeit und Zeitabhängigkeit eines möglichen inhibitorischen Effekts zu klären und erste Schritte zur Wirkungsweise zu untersuchen.

Ein zusätzlicher Fokus lag auf der Wirkung von Ax auf dem zytotoxischen CDTb-Eigeneffekt, der u.a. von der AG Barth beschrieben wurde. Dieser zeichnet sich durch eine andere Wirkungsweise an den Zellen aus. Hierbei sollten weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Ax gesammelt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten helfen, weitere Strategien und therapeutische Ansätze gegen Toxin-vermittelte Erkrankungen wie die Pseudomembranöse Kolitis und das toxische Megakolon zu finden. Durch einen Anstieg an Antibiotika-Resistenzen und hypervirulenten *C. difficile* Stämme gilt es in Zukunft zusätzliche Therapien zu etablieren, insbesondere gegen die krankheitsverursachenden Toxine. Potenziell wirksame, alte Medikamente wie Ax könnten aufgrund ihrer jahrzehntelangen klinischen Erprobung eine sichere und kostengünstige Möglichkeit bei der Bekämpfung von CDIs bieten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav	Webeco, Stuttgart (D)
Brutschrank, HERAcell 240i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen, Isernhagen (D)
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Bioscience, Freiburg (D)
EL 340 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall (D)
EVOM2™ epithelial Voltohmmeter	World Precision instruments, LLC, Sarasota (USA)
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen (D)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen (D)
Gefrierschrank Hera freeze (-80 °C)	Heraeus, Hanau (D)
Gelkammer Perfect Blue Doppelgelsystem Twin ExW S	peqLab Biotech GmbH, Erlangen (D)
Glasplatte ausgeschnitten 20 x 10 cm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen (D)
NanoDrop™ One	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Mikrozentrifuge Rotilabo®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Magnetrührer RET basic C	IKA Werke, GmbH & Co. KG, Staufen (D)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Oberkochen (D)
Mikroskop-Kamera ProgRes™ C10*plus*	Jenoptik, Jena (D)
Multikanalpipette/Transferpette-8 (50-200 µL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim (D)
Perfect Blue Semi -Dry	PeqLab Biotech GmbH, Erlangen (D)
pH-meter into Lab pH 270	WTW GmbH, Weilheim (D)
Pipetten Eppendorf Research Plus (0,1 µl-2.5 µl)	Eppendorf AG, Hamburg(D)
Pipetboy	INTEGRA Bioscience GmbH, Fernwald (D)

Geräte	Hersteller
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Rotationsschüttler REAX 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Scanner Epson Perfection 2480 Photo	Epson, Suwa (J)
Sicherheitswerkbank HERASafe HS 12	Heraeus, Hanau (D)
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Vacuboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald (D)
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Waage Kern EG 2200 – 2 MM	KERN & SOHN GmbH, Balingen (D)
Wasserbad AQUAline AL18	Lauda, Königshofen (D)
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (D)

2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Blotting Papier MN827 B	Macherey-Nagel Gmbh & Co.KG, Düren (D)
Deckgläser	Menzel GmBH, Braunschweig (D)
Entwickler und Fixierer, RTU60	Adefo Chemie GmBH, Braunschweig (D)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Merck Millipore, Billerica (USA)
Medical X-ray Film Cronex 5, 100 NIF	AGFA HealthCare N.V., Mortsel (BE)
Mikroreagenzgefäß (0,5 / 1,5 / 2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Mikrotiterplatten (12-/24- und 96-*well*-Platten)	TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen (CH)
Millicell Hanging Cell Culture Insert, 24-well	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Nitrozellulose- Transfer-Membran	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala (SWE)
Parafilm “M”	Bemis Company Inc., Neenah (USA)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim (D)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Schlauchfolie	HT-Verpackungen, Esslingen (D)
Serologische Pipetten (5/10/25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zählkammer Neubauer	LO-Laboroptik GmBH, Friedrichsdorf (D)
Zellkulturschale (d = 10 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)

2.1.3 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Chemikalien und Substanzen	Lieferant
6-Biotin-17-NAD^+	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Acrylamid /BIS 30%	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS-Substrat)	Promega GmbH, Walldorf (D)
complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Mannheim (D)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis GmbH, Mannheim (D)
Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
ECL-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethanol	VWR Chemicals, Darmstadt (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glycerin	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)

Chemikalien und Substanzen	Lieferant
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH2PO4)	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin (D)
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Milchpulver	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumazid	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Natrium-Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Page Ruler Prestained Protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ponceau-S	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
SDS-Pellets	Carl Roth GmBH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Staurosporin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%	J. T. Baker, Griesheim (D)

2.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration / Menge
ADP-Nachribosylierungspuffer (pH 7,5)	Tris (pH 7,5) EDTA	20 mM 1 mM

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration / Menge
	DTT	1 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	H_2O	
Coomassie Entfärbungslösung	Methanol	45 %
	Eisessig	10 %
	H_2O	45 %
Coomassie Färbungslösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 %
	Methanol	45 %
	Eisessig	10 %
	H_2O	45 %
ECL A Lösung	Tris-HCl 1 M (pH 9,0)	500 µl
	250mM Luminol	50 µl
	90 mM Coumarsäure	22 µl
	H_2O	4,4 ml
ECL B Lösung	Tris-HCl 1 M (pH 9,0)	500 µl
	30 % H_2O_2	50 µl
	H_2O	4,5 ml
Laemmli Probenpuffer (5x)	1 M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,31 mM
	SDS	10 %
	Glycerin	50 %
	Bromphenolblau	0,015 %
	DTT	10 %
	H_2O	
PBS (1x)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na_2HPO_4 – Dihydrat	8,0 mM
	KH_2PO_4	1,8 mM
	H_2O	
PBS (10x)	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM

Puffer / Lösungen	**Zusammensetzung**	**Konzentration / Menge**
	Na_2HPO_4 – Dihydrat	80 mM
	KH_2PO_4	18 mM
	H_2O	
PBS-T	PBS (10x)	10 %
	Tween® 20	0,1 %
	H_2O	
Ponceau S	Ponceau S	0,2 %
	Eisessig	5 %
	H_2O	
Sammelgelpuffer	Tris – HCl (pH 6,8)	0,5 M
	H_2O	
Sammelgel 12,5 %	H_2O	8 ml
	Sammelgelpuffer	6,2 ml
	10 % SDS	273 µl
	Acrylamid /BIS 30 %	8,3 ml
	Ammoniumperoxodisulfat	248 µl
	TEMED	25 µl
SDS- Laufgelpuffer (1x)	10 x SDS – Laufgelpuffer	10 %
	SDS	0,1 %
	H_2O	
10 x SDS-Laufgelpuffer (10x)	Tris	0,25 mM
	Glycin	1,9 mM
	H_2O	
Trenngelpuffer	Tris – HCl (pH 8,8)	1,5 M
	H_2O	
Trenngel	H_2O	8 ml
	Sammelgelpuffer	3,8 ml
	10 % SDS	150 µl
	Acrylamid /BIS 30 %	3 ml
	Ammoniumperoxodisulfat	150 µl

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration / Menge
	TEMED	17 µl
Stripp-Puffer A (pH 2,0)	Glycin NaCL H_2O	0,2 M 0,5 M
Stripp-puffer B (pH 11,0)	Tris H_2O	0,5 M
Towbin blotting Puffer	SDS Laufgelpuffer (10x) Methanol H_2O	10 % 20 %
Tris-HCl (pH 6,8)	Tris-HCl H_2O	1 M

2.1.5 Verwendete Zelllinien

Vero Zellen

Vero Zellen (ATCC: CCL-81) sind epitheliale Zellen und wurden aus normalen Nierenzellen der Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus*) gewonnen.

CaCo-2 Zellen

CaCo-2 Zellen (ATCC: HTB-37) sind epitheliale, humane, kolorektale Adenokarzinomzellen

2.1.6 Nährmedium

Medium	Zusammensetzung		Für
DMEM	10 % 1,5 g/l 1 mM 0,1 mM 10 g/l	FCS Natriumhydrogencarbonat Na-Pyruvat nicht essentielle Aminosäuren Penicillin/Steptomycin	CaCo-2
MEM	10 % 1,5 g/l	FCS Natriumhydrogencarbonat	Vero

Medium	Zusammensetzung		Für
	1 mM	Na-Pyruvat	
	2 mM	L-Glutamin	
	0,1 mM	nicht essentielle Aminosäuren	
	10 g/l	Penicillin/Steptomycin	

2.1.7 Toxine

TcdA, TcdB: TcdA und TcdB wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Aktories (Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg) bereitgestellt. Beide Toxine wurden bei -80°C gelagert. Abgefüllte Aliquots wurden bei 4°C für max. 7 Tage verwendet.

CDT: CDTa und CDTb wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Aktories (Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg) bereitgestellt. Beide Toxinkomponenten wurden bei -80°C gelagert. Abgefüllte Aliquots wurden bei 4°C für max. 7 Tage verwendet.

2.1.8 Inhibitor

Ax: Ax wurde freundlicherweise von Dr. Giorgio Fois (Institut für Allgemeine Physiologie, Universität Ulm) bereitgestellt. Ax wurde bei -20°C gelagert. Ax wurde in seiner Salzform als Ax-HCL eingesetzt.

2.1.9 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-GAPDH	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Anti-Hsp90	Maus	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Anti-Rac1	Maus	1:1000	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
Streptavidin Peroxidase		1:2500	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)

Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG, binding protein HRP	Ziege	1.2500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)

2.1.10 Softwareprogramme

Softwareprogramm	Hersteller
AxioVision Rel. 4.9.	Carl Zeiss AG, Göttingen (D)
Adobe® Photoshop® 2020	Adobe Inc., San José (USA)
Citavi 6.7	Swiss Academic Software, Wändeswil (CH)
GraphPad 6	GraphPad Software, San Diego (USA)
ImageJ 1.51q	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Live Acquisition v2.6	FEI, München (D)
Microsoft® Office 365	Microsoft Corporate, Washington (USA)
Offline Analysis v2.6	FEI, München (D)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Bei den Experimenten wurden verschiedene Zelllinien benutzt, die mit unterschiedlichem Medium behandelt wurden. Alle Zelllinien wurden mit ihrem jeweiligen Medium (siehe Materialien) in 10 cm großen Zellkulturschalen bei 5 % CO_2 und 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, wenn eine ausreichende Konfluenz von 70-100 % erreicht war. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließenden mit 2 ml 0,25 % Trypsin für 2-5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich von der Zellkulturschale lösten. Durch Zugabe von 8 ml neuem Nährmedium wurde das Trypsin deaktiviert. Die Zellen konnten dann zur weiteren Benutzung in einem Zellexperiment gezählt und in Mikrotiterplatten ausgesät werden. Bei weiterer Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 für 2 Tage und 1:5 bzw. 1:8 (Vero Zellen) für 3 Tage

gesplittet und mit neuem Nährmedium in 10 cm Zellkulturschalen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden bis etwa zur 25. Passage verwendet.

2.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht in einem elektrischen Feld wurde eine SDS-Page angewendet. Durch das anionische Tensid SDS wurden die Proteine denaturiert und negativ geladen. Dadurch unterschieden sich Proteine nur noch in ihrer Größe voneinander und die Matrix des Polyacrylamids ließ größere Proteine langsamer zur Anode wandern als kleinere. So wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proben wurden mit 5x Laemmli-Puffer mit 10 % DTT versetzt und dann für 10 min bei 95 °C erhitzt. Dies führte zur Denaturierung der Proteine sowie zusätzlich zur Reduktion von Disulfidbrücken durch Dithiothreitol (DTT). Die Proben wurden dann auf das 12,5 % Gel (siehe Material) aufgetragen und für 1h bei 37 mA laufen gelassen. Zur späteren Differenzierung der Proteine wurde ein Marker hinzugefügt.

2.2.3 Western-Blot

Beim Western-Blot wurden die durch das SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch die *Semi-Dry*-Blotting Apparatur wurde ein elektrisches Feld erzeugt, sodass die geladenen Proteine Richtung Nitrocellulosemembran wanderten. Zunächst wurden 3 *Whatman paper* in die Apparatur gelegt, die Nitrocellulosemembran, das Gel aus der SDS-Page und anschließend nochmals 3 *Whatman paper* darüber. Die *Whatman paper* wurden in Towbin-Puffer getränkt. Nach Schluss der Apparatur und Anlegen einer definierten Stromstärke (1,5 mA pro cm^2 Membran) wanderten die Proteine innerhalb einer Stunde Richtung Anode.

Anschließend wurde das Polyacrylamidgel für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit Coomassie-Färbungslösung behandelt, um Proteinrückstände auf dem Gel aufzuzeigen. Durch die Coomassie-Entfärbungslösung wurde das Polyacrylamidgel danach soweit entfärbt, dass Banden und Proteinrückstände sichtbar wurden. Gleichzeitig wurde die Membran für 10 min mit Ponceau S bei RT auf der Wippe gefärbt. Dadurch konnte überprüft werden, ob Proteine auf die Membran übertragen wurden, da Ponceau S als ein roter Azofarbstoff reversibel und unspezifisch an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet. Die Membran wurde anschließend kurz gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen auf der

Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran anschließend mit 5 % Milchpulver in PBS-Tween® 20 (PBS-T) für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert oder alternativ bei 4 °C über Nacht. Die Membran wurde kurz gewaschen, um restliches Milchpulver zu entfernen. Zur Detektion wurde bei Biotin-markierten Proteinen die Membran mit Streptavidin—Peroxidase (Strep-POD) im Verhältnis 1:2500 in 10 ml PBS-T für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4-mal für jeweils 4 min mit PBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Bei nicht Biotin-markierten Proteinen wurde zuerst die Membran mit dem Erstantikörper in der jeweiligen Verdünnung mit 10 ml PBS-T für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Alternativ konnte dieser Schritt bei 4 °C über Nacht erfolgen. Anschließend wurde die Membran 4-mal für jeweils 4 min mit PBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Nun wurde der Zweitantikörper in der Verdünnung 1:2500, in 10 ml PBS-T gelöst, auf die Membran gegeben und für 1 h auf die Wippe gestellt. Die Membran wurde anschließend erneut 4-mal für 4min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz durch Zugabe von ECL-Lösung. Das in der ECL-Lösung A enthaltene Luminol wurde durch eine Peroxidase und durch das in der Lösung B enthaltene H_2O_2 zu 3-Aminophthalsäure oxidiert. Durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilmes konnte die entstandene Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

2.2.4 Strippen der Nitrocellulosemembran

Das Strippen der Membran erfolgte, um gebundene Antikörper abzuwaschen und ein erneutes Detektieren zu ermöglichen. Zunächst wurde die Membran mit der Stripping-Puffer Lösung A für 5 min bei RT auf der Wippe inkubiert und danach 15-mal kurz mit H_2O gewaschen. Mit der Stripping-Puffer Lösung B wurde die Membran für 10 min bei RT auf der Wippe inkubiert und erneut 15-mal kurz mit H_2O gewaschen. Die Membran musste für 1 h mit 5 % Milchpulver in PBS-T auf der Wippe inkubiert werden und konnte anschließend erneut mit Antikörpern zur Detektion behandelt werden.

2.2.5 Zytotoxizitätsversuche mit TcdA, TcdB und CDT auf Vero und CaCo-2 Zellen

Mit den Zytotoxizitätsversuchen wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen bei Zugabe von Toxin und Inhibitoren lichtmikroskopisch untersucht. Dafür wurde eine bestimmte Zellanzahl in Mikrotiterplatten (96-*Well*- und 24-*Well*-Platten) ausgesät und über ein bis zwei

Tage kultiviert, bis eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht wurde. Im weiteren Schritt wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit den Toxinen und Inhibitoren, die in FCS-freiem Medium vorbereitet wurden, in gewünschter Konzentration behandelt. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte Zellen genommen. Über 6 h wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und mit dem Lichtmikroskop beobachtet. Die Morphologieveränderungen wurden stündlich durch lichtmikroskopische Bilder dokumentiert bei einer 20-fachen Vergrößerung. In 96-*Well*-Platten wurden die Versuche als Triplikate durchgeführt und in 24-*Well*-Platten als Duplikate. Dabei wurden in 24-*Well*-Platten drei Bilder pro *Well* gemacht. Mit Hilfe des Softwareprogrammes ImageJ wurden die Zellen, die eine typische Vergiftungsmorphologie aufwiesen, gezählt und der prozentuale Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism 6.

2.2.6 MTS Zellviabilitätsassay

Der MTS-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Erfassung der Zellviabilität, d.h. der noch lebenden Zellen, in Zytotoxizitätsversuchen. Bei der Methode wird durch eine NAD(P)H abhängige Reaktion, das gelbe Tetrazoliumsalz MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) unter Vorhandensein von Phenazinmethosulfat in das blau-violette, wasserlösliche Formazan umgewandelt. Die Reduktionsäquivalente NADH/NADPH sind in stoffwechselaktiven Zellen vorhanden. Somit korreliert die Menge des gebildeten Formazans mit der Anzahl lebender Zellen. Tote Zellen können kein MTS mehr umsetzten.

Die Zellen wurden zunächst in einer 96-*well*-Platte ausgesät und mit dem jeweiligen Toxin sowie Ax behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Positivkontrollen wurden Zellen mit 20 % DMSO behandelt oder mit 1 nM Staurosporin. Zur Überprüfung der Intoxikation der Zellen wurden nach 24 h Bilder mit Hilfe des Lichtmikroskops gemacht. Anschließend wurden zu jeder Probe 10 µl MTS-Substrat gegeben und die Zellen 1 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm der Farbumschlag ausgewertet und im *EL 340 Microplate Reader* gemessen.

2.2.7 Vero Zelllysat herstellen

Zum Herstellen von Vero Zelllysat wurden mehrere konfluente Zellkulturschalen mit Vero Zellen verwendet. Es wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. In die Zellkulturschalen wurden je 100 µl ADP-Ribosylierungs Puffer mit im Verhältnis 1:50 enthaltenem *complete protease inhibitor* gegeben. Um die Zellen zu lysieren wurden sie anschließend über Nacht bei -20 °C eingefroren. Die Proteinmenge wurde mit der Hilfe des NanoDrop™ One bestimmt und die Mikroreagenzgefäße dementsprechend beschriftet.

2.2.8 *In vitro* Enzymaktivität von CDTa

Durch eine *in vitro* ADP-Ribosylierung von G-Aktin in Zelllysat konnte der Einfluss von Ax auf die enzymatische CDTa-Komponente untersucht werden. Dazu wurden 40 µg Vero Zelllysat mit ADP-Ribosylierungpuffer und 150 µM Ax in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5ml) pipettiert. Um ein gleichzeitiges Starten der Reaktionen zu ermöglichen, wurden 100 ng CDTa und 1 µl Biotin-markiertes NAD^+ an getrennte Stellen im Deckel pipettiert. Das Biotin-NAD^+ diente dem CDTa als Kofaktor für die ADP-Ribosylierung von G-Aktin. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 8 µl 5-fach Laemmlipuffer mit DTT dazugegeben. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt. Mittels SDS-Page (siehe oben) wurden die Proteine aufgetrennt und auf eine Membran mittels Western Blotting (siehe oben) übertragen. Die Membran wurde dann mit Strep-POD behandelt, um die Botin-markierten Proteine zu detektieren.

2.2.9 *In vitro* ADP-Nachribosylierung

Bei dieser Methode konnte der Anteil des G-Aktins bestimmt werden, dass im Zellversuch noch nicht durch CDTa ADP-ribosyliert wurde. Das restliche, nicht modifizierte Aktin wurde mit frisch hinzugefügtem CDTa und in Anwesenheit von Biotin-markiertem NAD^+ nachribosyliert und dessen Anteil durch Detektion mit Strep-POD sichtbar gemacht.
Zunächst wurde ein Zytotoxizitätsversuch in einer 24-*well*-Platte durchgeführt. Nach definierten Zeitpunkten wurde die Vergiftung durch Waschen und Einfrieren der Zellen bei -20°C gestoppt. Die weiteren Schritte fanden auf Eis statt. Nach Zugabe von 49 µl ADP-Ribosylierungs Puffer und 1 µl *complete protease inhibitor* wurden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt und 20 µl des Zelllysats in ein Mikroreaktionsgefäß übertragen. 100ng

CDTa und 1 µl Biotin-markiertes NAD^+ wurden in den Deckel pipettiert. Durch kurzes Zentrifugieren wurden die Reaktionen gleichzeitig gestartet und die Proben für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 8 µl 5-fach Laemmlipuffer mit DTT dazugegeben und die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt.

Mittels SDS-Page (siehe oben) wurden die Proteine aufgetrennt und auf eine Membran mittels Western Blotting (siehe oben) übertragen. Die Membran wurde dann mit Strep-POD behandelt, um die Botin-markierten Proteine zu detektieren.

2.2.10 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes im TEER Assay

Durch Ausbildung eines CaCo-2 Monolayers, bedingt durch eine sehr hohe Dichte an CaCo-2 Zellen, entstand ein elektrischen Widerstand, der im TEER Assay gemessen wurde. Durch die Toxin-induzierte Abrundung der Zellen kommt es zu einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten der konfluenten CaCo-2 Zellen mit erhöhter Permeabilität des dichten CaCo-2 Monolayers und eine Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstandes, der im TEER Assay gemessen wurde. Für einen konfluenten Monolayer wurden CaCo-2 Zellen in einer Dichte von $1{,}2x10^5$ Zellen pro Filter (*hanging cell culture inserts*) ausgesät und bei 37 °C für 3-4 Tage inkubiert. Zum Start des Experimentes wurden die Toxine und die Inhibitoren apikal hinzugefügt und der elektrische Widerstand gemessen. Weitere Messungen wurden zu definierten Zeitpunkten wiederholt und die Veränderungen im elektrischen Widerstand verfolgt. Um den finalen Wert zu erhalten, wurde von den gemessenen absoluten Werten der Widerstand eines leeren Filters abgezogen und anschließend mit der Filtergröße (0,3 cm^2) multipliziert.

2.2.11 Detektion von intrazellulärem Rac1 nach Behandlung mit TcdA und TcdB

Um eine Inhibition von TcdA und TcdB sichtbar zu machen, wurde ein Rac1-Antikörper verwendet, der nicht mehr an glykosyliertes Rac1 bindet. Je weniger Rac1 durch TcdA und TcdB modifiziert wurde, umso stärker waren die Banden bei der Detektion.

Zunächst wurde ein Zytotoxizitätsversuch mit TcdA oder TcdB in einer 24-*well*-Platte durchgeführt. Nach einer definierten Zeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Zur Zelllyse wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend mit 50 µl 95 °C heißem 2,5-fach Laemmlipuffer mit DTT abgekratzt und

für weitere 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert. Mittels SDS-Page (siehe oben) wurden die Proteine aufgetrennt und auf eine Membran mit Hilfe von Western Blotting (siehe oben) übertragen. Die Membran wurde anschließend mit einem Rac1-Antikörper, 1:1000 in PBS-T gelöst, behandelt. Als Zweitantikörper diente das Anti-mouse IgG binding protein HRP, das im Verhältnis 1:2500 in PBS-T gelöst wurde. Die Detektion erfolgte mit gekaufter ECL-Lösung.

2.2.12 Untersuchung der Bindung von CDTb an Vero Zellen

Um den Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb an Vero Zellen zu zeigen, wurde ein FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) Experiment durchgeführt. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten Antiköpern oder Stoffen auf bestimmte Eigenschaften untersucht. Dazu wurden Zellen aus 3 Zellkulturschalen einmal mit PBS gewaschen und für 30 min bei 37 °C mit jeweils 3 ml einer aus 25 mM EDTA und PBS bestehenden Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut für 4 min bei 700 rpm zentrifugiert. Das PBS wurde vorsichtig entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden für die Stocklösung $1x10^6$ Zellen in 1 ml Medium gelöst. Die nächsten Schritte erfolgten auf Eis. Desweitern wurden 200 µl Stocklösung zusammen mit 2,4 µg/ml CDTb-488 und 150 µM Ax für 4 min bei 4 °C und 500 rpm zentrifugiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die nur mit Ax behandelt wurden. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen und erneut für 4 min bei 4 °C und bei 500 rpm zentrifugiert. Das PBS wurde vorsichtig abgesaugt und durch 200 µl Medium ersetzt. Anschließend wurde mit Hilfe des FACS der Effekt von Ax auf die Bindung von Fluoreszenz-markiertem CDTb-488 an Vero Zellen analysiert.

3 Ergebnis

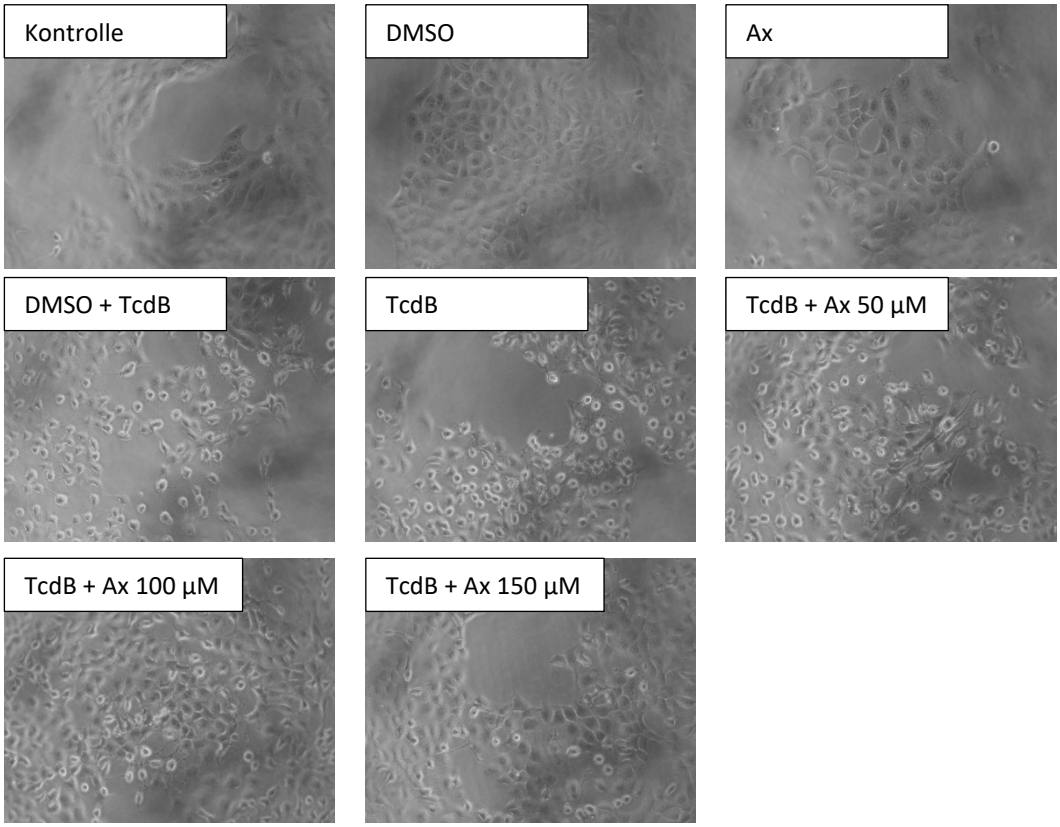
3.1 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdA und TcdB

TcdA und TcdB sind die Haupttoxine von *C. difficile*, die durch Glykosylierung regulatorischer Rho Proteine wie Rac1 eine Störung des Zytoskelettaufbaus und –abbaus verursachen (siehe Einleitung). Dieser Effekt lässt sich lichtmikroskopisch beobachten und ist charakterisiert durch eine Änderung der Zellmorphologie mit Abrundung der Zellen, Verlust der Zelladhärenz und Lösung der Zell-Zell-Kontakte. Diese morphologischen Veränderungen werden genutzt, um den zeitlichen Verlauf der Vergiftung zu beurteilen. Da diese Veränderung bei der etablierten Vero Zelllinie sehr charakteristisch und leicht zu erkennen sind, wurde diese primär zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen verwendet.

3.1.1 Inhibitorischer Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdB

Um die Wirkung von Ax auf TcdB vergiftete Vero Zellen zu charakterisieren, wurde Ax in drei unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit TcdB verwendet. Um Eigeneffekte von Ambroxol oder dessen Lösungsmittel DMSO zu erkennen, wurde der Versuchsanordnung Kontrollen mit DMSO und Ax in Höchstkonzentration beigefügt. Eine weitere Kontrollgruppe wurde hinzugefügt, um einen Effekt von DMSO auf die Vergiftung mit TcdB auszuschließen. Für die Vergiftung wurden 5 pM TcdB sowie verschiedene Konzentrationen an Ax (50 µM, 100 µM und 150 µM) genutzt, um diese hinsichtlich ihrer inhibitorischen Effekte vergleichen zu können. Die Effekte wurden lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert (siehe Abbildung 5). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und sechsmal wiederholt. Die reproduzierbaren Ergebnisse werden an einem Einzelversuch exemplarisch dargestellt.

A



B

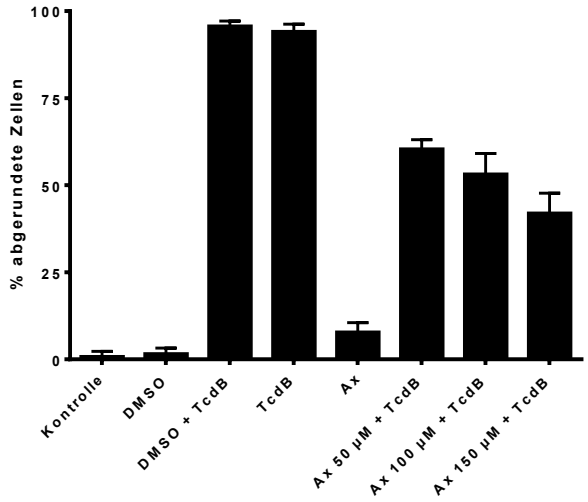


Abbildung 5: Effekt von TcdB und Ax auf die Morphologie von Vero Zellen nach 5 h

A Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 5 pM TcdB über 5 h inkubiert. Die vergifteten Vero Zellen wurden zusätzlich mit aufsteigenden Konzentrationen (50 µM, 100 µM und 150 µM) an Ax behandelt. Um einen Eigeneffekt von Ax und dessen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) auszuschließen, wurden diese zusammen mit einer unbehandelten Probe als Kontrollen eingefügt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und sechsmal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch dokumentiert und zu einem definierten Zeitpunkt analysiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Zur besseren Darstellbarkeit wurden die abgerundeten Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die Auszählung wurde mit dem Softwareprogramm ImageJ vorgenommen. Nach 5 h Inkubationszeit mit TcdB konnte gezeigt werden, dass ungefähr 90 % der Zellen morphologische Veränderungen aufzeigten, während dies bei Zugabe von 150 µM Ax weniger als 50 % der Zellen waren. Dieser Effekt war ebenfalls bei niedrigeren Ax Konzentrationen mit einer geringeren Ausprägung zu erkennen (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Während bei den Kontrollen keine morphologischen Veränderungen zu sehen waren, zeigten die Zellen, die nur mit TcdB behandelt wurden, zu 75 % - 100 % typische morphologische Vergiftungsanzeichen. Durch die Zugabe von DMSO konnte kein Einfluss auf die Vergiftung mit TcdB festgestellt werden. Dagegen konnte bei der Behandlung mit Ax eine Reduktion der Anzahl an abgerundeten Zellen festgestellt werden. Dieser Effekt war größer je höher die Konzentration an Ax war. Bei der verwendeten Höchstkonzentration von 150 µM Ax wurde die größte Reduktion der Anzahl an abgerundeten Zellen festgestellt und nahm bei niedrigeren Konzentrationen an Ax ab.
Da eine deutliche Reduktion des Anteils an abgerundeten Zellen durch die verwendeten Konzentrationen von Ax erzielt werden konnte, wurde von einem Hemmeffekt von Ax nach 5 h auf die Vergiftung mit TcdB ausgegangen. Zudem zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit von Ax auf die Vergiftung.

Zeitlicher Verlauf der Vergiftung von TcdB auf Vero Zellen

Um eine Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Ax zu beurteilen, wurde der zeitliche Verlauf einer Vergiftung mit TcdB und Ax an Vero Zellen untersucht. Hierbei wurden in einem Zytotoxizitätsversuch stündlich die lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen fotografisch dokumentiert und anschließend die abgerundeten Zellen gezählt und mit der Gesamtzellzahl verglichen. Es wurden drei Konzentrationen von Ax (50 µM, 100 µM und 150 µM) verwendet, welche in vorherigen Experimenten bereits einen inhibitorischen Effekt auf die Vergiftung zeigten. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet (siehe Abbildung 6).

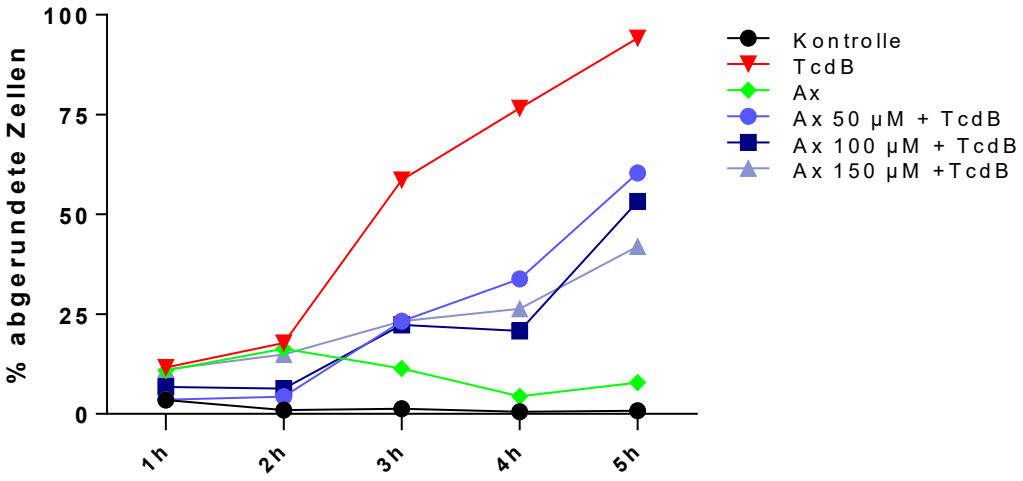


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf einer TcdB Vergiftung mit Ax auf Vero Zellen

Die Zellen wurden zum Zeitpunkt t=0 h (nicht dargestellt) mit 2 pm TcdB und aufsteigenden Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 150 µM) an Ax inkubiert. Dazu wurde eine Kontrollgruppe mit unbehandelten Zellen und eine Kontrolle mit der Höchstkonzentration (150 µM) an Ax etabliert. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch verfolgt und stündlich fotographisch dokumentiert. Anschließend wurde mit ImageJ auf Grundlage der Bilder die abgerundeten Zellen gezählt und im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Eine fast vollständige Vergiftung der Vero Zellen mit TcdB trat nach 5 h ein. Durch die Zugabe von Ax kam es zu einem langsameren Anstieg an abgerundeten Zellen über 5 h und damit zu einer inhibitorischen Wirkung auf TcdB-vergiftete Vero Zellen. Dabei zeigte eine höhere Konzentration von Ax einen stärkeren inhibitorischen Effekt als eine niedrigere Konzentration. In der Kontrollgruppe der unbehandelten Zellen und wurde kein Anstieg der abgerundeten Zellen festgestellt und ebenfalls führte Ax allein nicht zu einem Anstieg an abgerundeten Zellen. Die Ergebnisse zeigten zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit eine Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Ax auf TcdB-vergiftete Vero Zellen.

Hemmeffekt von Ax auf TcdB-vergiftete Vero Zellen nach 24 h bzw. 48 h

Um zu überprüfen, ob die Hemmung länger als 5 h andauert, wurde die Zellviablität nach 24 h bzw. 48 h gemessen. Die Zellmorphologie wurde die ersten 6 h sowie nach 24 h bzw. 48 h lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert (nicht dargestellt). Nach 24 h bzw. 48 h wurde ein MTS-Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Die im MTS-Assay gemessene Absorption ließ Rückschlüsse auf die Zellviabilität zu und wurde auf die Kontrolle genormt (siehe Abbildung 7).

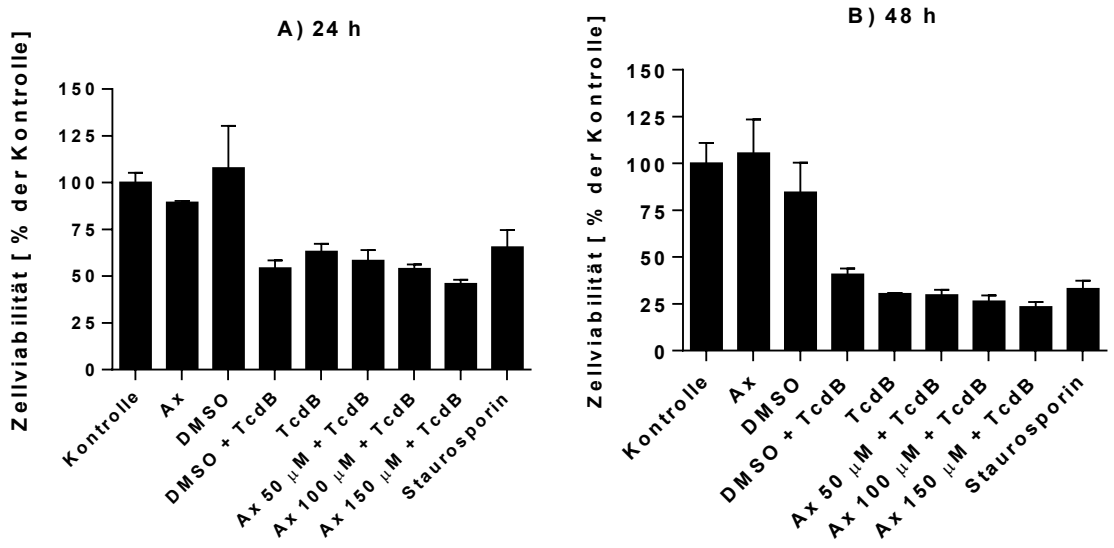


Abbildung 7: Zellviabilität von Vero Zellen 24 h bzw. 48 h nach TcdB Vergiftung und Ax Behandlung

Die Vero Zellen wurden mit 5 pm TcdB und verschiedenen Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 150 µM) Ax behandelt. Dazu wurde eine Kontrolle mit Ax und eine mit unbehandelten Zellen (Kontrolle) hinzugefügt. Staurosporin (1 nM) diente als Positivkontrolle. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die Zellen jeweils für eine 1 h mit 10 µl MTS-Reagenz pro *Well* inkubiert und mit Hilfe des *E340 microplate reader* wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm der Farbumschlag gemessen. Die Zellviabilität wurde auf die Kontrolle genormt (n=3).

Beim Vergleich zur Positivkontrolle mit Staurosporin zeigten TcdB-vergiftete Zellen nach 24 h und 48 h eine ebenso starke Reduktion der Zellviabilität. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Ax konnte dabei eine Reduktion der Zellviabilität nicht verhindern. Tatsächlich zeigte sich eine leicht stärkere Reduktion der Zellviabilität bei den zusätzlich mit Ax behandelten TcdB-vergifteten Zellen, was allerdings auf natürliche Schwankungen zurückzuführen ist. Eine Behandlung nur mit Ax zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Zellviabilität nach 24 h bzw. 48 h. Einen langanhaltenden inhibitorischen Effekt von Ax über 24 h konnte nicht gezeigt werden.

Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Ax auf TcdB-vergiftete Vero Zellen

Da sich schon in vorherigen Versuchen eine konzentrationsabhängige Hemmung von TcdB durch Ax auf Vero Zellen andeutete, sollte dies weiter evaluiert werden. Dazu wurde die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen Ax (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM,

100 µM, 150 µM und 300 µM) auf TcdB-vergiftete Vero Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 10 pM TcdB behandelt und ein Zytotoxizitätsversuch durchgeführt, bei dem die Zellen stündlich lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert wurden. Anschließend wurden die abgerundeten Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl gesetzt (siehe Abbildung 8).

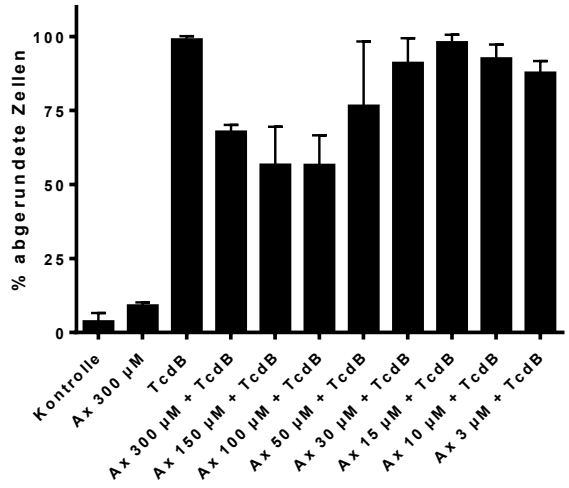


Abbildung 8: Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Ax auf die Morphologie von TcdB—vergifteten Vero Zellen nach 5 h

In dem Zytotoxizitätsversuch wurden die Zellen für 5 h mit 10 pM TcdB inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) an Ax behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen sowie eine weitere Kontrolle mit 300 µM Ax hinzugefügt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und viermal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Mit ImageJ wurde auf Grundlage der Bilder (nicht dargestellt) die abgerundeten Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellanzahl gesetzt (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

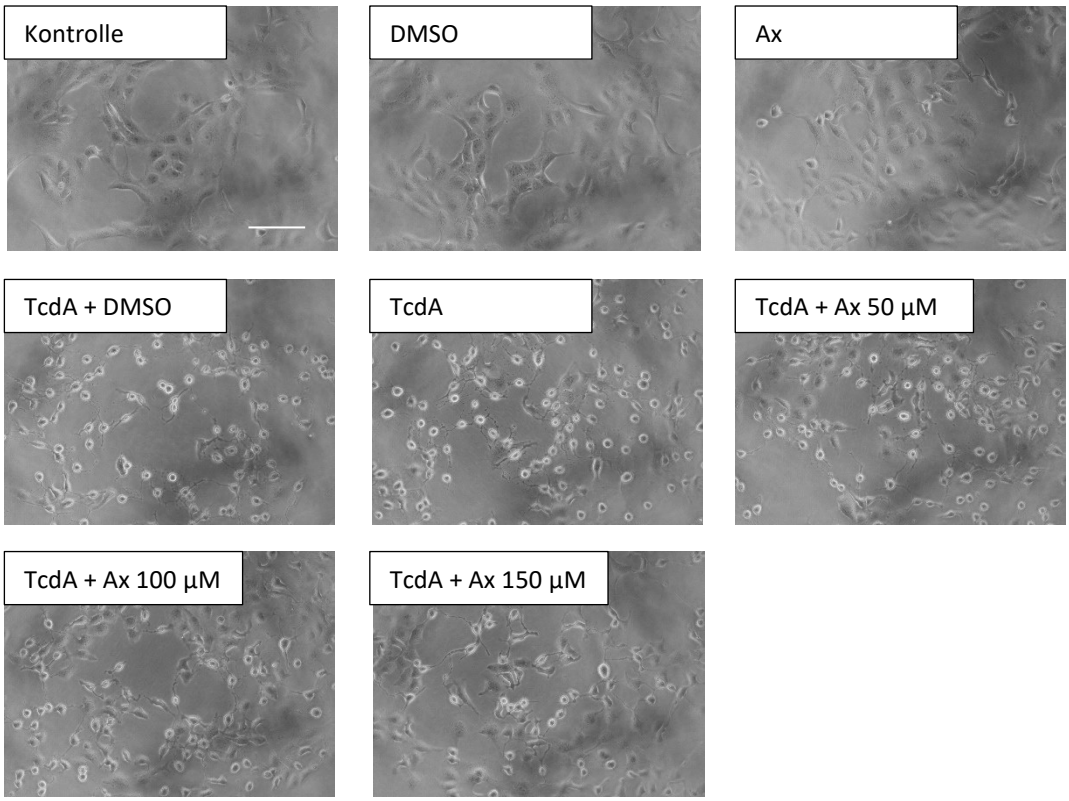
Eine fast vollständige Abrundung der Vero Zellen nach TcdB Vergiftung zeigte sich nach 5 h. Deutlich weniger abgerundete Zellen wurden nach 5 h bei Zugabe von >50 µM Ax beobachtet. Eine Reduktion der abgerundeten Zellen konnte zwar schon bei 50 µM Ax beobachtet werden, jedoch zeigte sich hier eine große Diversität innerhalb der Proben, die zu hohen Standardabweichungen (SD) führten. Die stärksten inhibitorischen Effekte wurden bei Konzentrationen von 100 µM und 150 µM Ax beobachtet. Höhere Konzentration an Ax führten zu einem erneuten Anstieg an abgerundeten Zellen.

Es konnte somit ein konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von Ax auf TcdB-vergiftete Vero Zellen gezeigt werden, dessen Wirkung am stärksten bei Konzentrationen zwischen 100 µM und 150 µM Ax war.

3.1.2 Inhibitorischer Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero – Zellen mit TcdA

Da ein inhibitorischer Effekt von Ax auf TcdB feststellbar war, wurde die Wirkung von Ax ebenfalls auf TcdA-vergiftete Vero Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit TcdA (5 pM) vergiftet und zusätzlich mit Ax in unterschiedlichen Konzentrationen (50 µM, 100 µM und 150 µM) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und zum Ausschluss von Eigeneffekten von Ax und DMSO auf die Vero Zellen und die Vergiftung wurden weitere Kontrollen hinzugefügt. Die Effekte wurden lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert (siehe Abbildung 9). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und fünfmal wiederholt. Die reproduzierbaren Ergebnisse werden an einem Einzelversuch exemplarisch dargestellt.

A



B

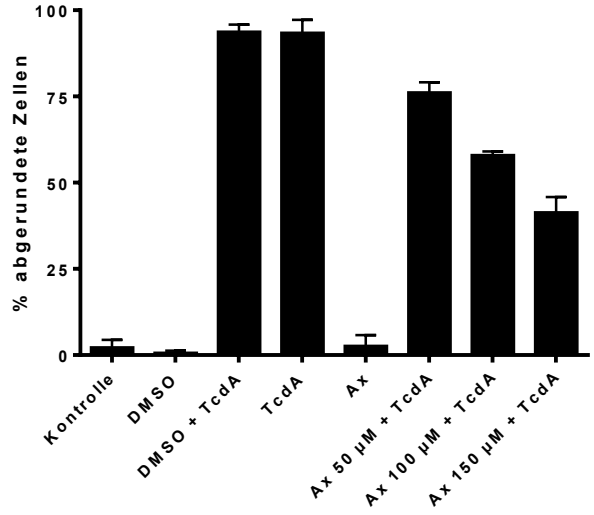


Abbildung 9: Effekt von TcdA und Ax auf die Morphologie von Vero Zellen nach 5 h

A Vero Zellen wurden mit einer Konzentration von 5 pM TcdA für 5 h inkubiert. Die zusätzlich mit Ax gekennzeichneten Proben wurden mit aufsteigenden Konzentrationen (50 µM, 100 µM und 150 µM) an Ax behandelt. Um einen Eigeneffekt von Ax und dessen Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurden diese zusammen mit einer unbehandelten Probe als Kontrolle eingefügt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und fünfmal wiederholt. Die Veränderungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Die abgerundeten Zellen wurden gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die Auszählung wurde mit dem Softwareprogramm ImageJ vorgenommen. Es zeigte sich, dass nach 5 h Inkubationszeit mit TcdA ungefähr 90 % der Zellen morphologische Veränderungen zeigten, während dies bei Zugabe von 150 µM Ax weniger als 50 % der Zellen waren. Der Effekt konnte auch bei niedrigeren Konzentrationen von Ax beobachtet werden mit einer weniger starken Ausprägung (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Nach 5 h Inkubationszeit konnte man einen Unterschied, zwischen TcdA-vergifteten Vero Zellen und zusätzlich mit Ax behandelten Zellen feststellen. So zeigten fast alle TcdA vergifteten Zellen eine Abrundung, während weniger abgerundete Zellen bei zusätzlich mit Ax behandelten Zellen zu erkennen waren. Dabei konnte beobachtet werden, dass der inhibitorische Effekt mit zunehmender Konzentration von Ax größer wurde. Bei einer Konzentration von 150 µM zeigten weniger als die Hälfte der Zellen morphologische Vergiftungszeichen, während geringere Konzentrationen einen weniger starken inhibitorischen Effekt zeigten. Eine Behandlung mit DMSO zeigte keinen Effekt auf unbehandelte Zellen oder auf die Vergiftung mit TcdA. Nur mit Ax behandelte Zellen wiesen nach 5 h keine Besonderheiten im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. Ein Hemmeffekt von Ax konnte bei Konzentrationen zwischen 50 µM und 150 µM auf TcdA-vergiftete Vero Zellen gezeigt werden.

Zeitlicher Verlauf der Vergiftung von TcdA auf Vero Zellen

Um eine Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Ax auf TcdA zu beurteilen, wurde der zeitliche Verlauf einer Vergiftung mit TcdA und Ax an Vero Zellen untersucht. Hierbei wurde in einem Zytotoxizitätsversuch stündlich die lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen fotografisch dokumentiert und anschließend die abgerundeten Zellen gezählt und mit der Gesamtzellzahl verglichen. Es wurden drei Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 150 µM) von Ax verwendet, die zuvor einen inhibitorischen Effekt auf die Vergiftung gezeigt haben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und mit Ax behandelte Zellen (siehe Abbildung 10). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt.

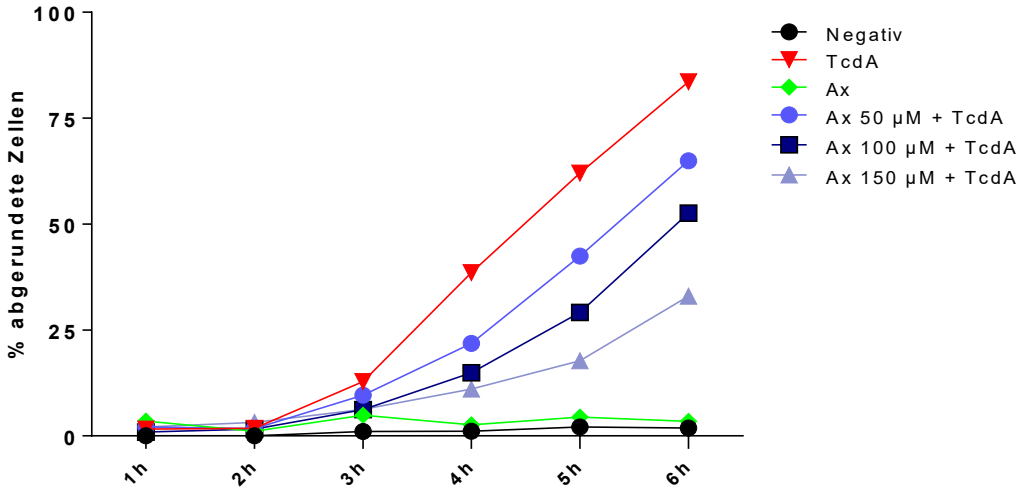


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf einer TcdA Vergiftung mit Ax bei Vero Zellen bis 6 h

Die Zellen wurden zum Zeitpunkt t=0 h (nicht dargestellt) mit 5 pM TcdA und aufsteigenden Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 150 µM) an Ax inkubiert. Dabei wurden die gemachten Beobachtungen lichtmikroskopisch verfolgt und stündlich fotographisch dokumentiert. Anschließend wurde mit ImageJ auf Grundlage der Bilder die abgerundeten Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellanzahl gesetzt (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Im zeitlichen Verlauf des Versuches über 6 h konnte man den hemmenden Einfluss von Ax auf die Vergiftung erkennen. Der schnellste Anstieg an abgerundeten Zellen konnte bei einer alleinigen Inkubation mit TcdA beobachtet werden. Bei Zugabe von Ax wurde ein deutlich langsamerer Anstieg über 6 h und weniger abgerundete Zellen nach 6 h beobachtet. Dabei zeigte eine höhere Konzentration von Ax einen stärkeren inhibitorischen Einfluss auf die Vergiftung als eine niedrigere Konzentration. Die Kontrolle sowie nur mit Ax behandelte Zellen zeigten keine morphologischen Vergiftungszeichen. Durch den Versuch konnte eine zeitabhängige Inhibition von Ax auf TcdA-vergiftete Vero Zellen demonstriert werden. Außerdem konnten bereits erste Hinweise auf eine konzentrationsabhängige Hemmung gezogen werden.

Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Ax auf TcdA-vergiftete Vero Zellen

Um die Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Ax auf TcdA-vergiftete Vero Zellen näher im Detail zu untersuchen, wurden Zellen mit TcdA und unterschiedlichen Konzentrationen (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) Ax inkubiert. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert und anschließend die abgerundeten Zellen gezählt und mit der Gesamtzellzahl

ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 11). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und viermal wiederholt.

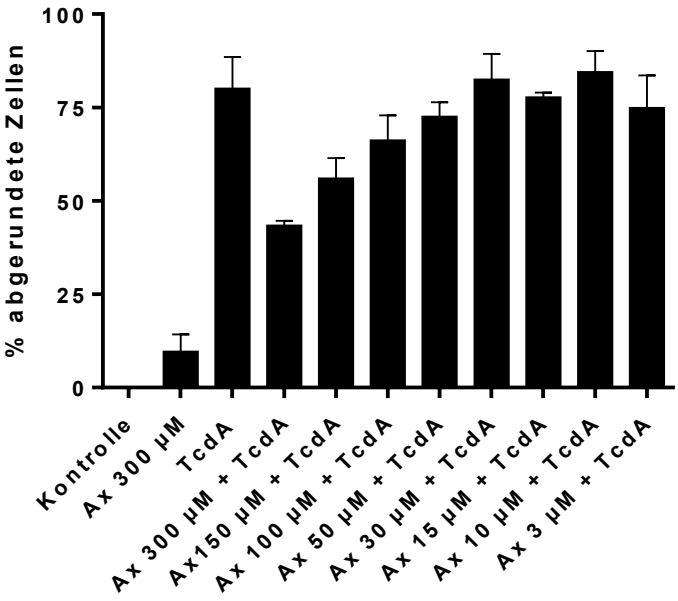


Abbildung 11: Effekt von verschiedenen Konzentrationen von Ax auf die Morphologie von TcdA—vergifteten Vero Zellen nach 4 h

In einem Zytotoxizitätsversuch wurden die Zellen für 4 h mit 5 pM TcdA inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) Ax behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen sowie mit 300 µM Ax behandelte Zellen eingefügt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert. Mit ImageJ wurde auf Grundlage der Bilder (nicht dargestellt) die abgerundeten Zellen gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellanzahl gesetzt (n=3).

Durch die Inkubation mit TcdA zeigten die Zellen nach 4 h deutliche Vergiftungszeichen in Form von abgerundeten Zellen. Diese Effekte konnten durch die Anwesenheit von Ax verringert werden. Allerdings zeigten erst höhere Konzentrationen einen ausgeprägten Effekt. So konnten bei Konzentration von 100 µM, 150 µM und 300 µM Ax eine Reduktion der abgerundeten Zellen nach TcdA Vergiftung beobachtet werden. Bei geringeren Konzentrationen war dieser Effekt nicht vorhanden und es konnte kein Unterschied im Vergleich zu einer TcdA-Vergiftung von Vero Zellen festgestellt werden. Der ausgeprägteste Effekt bei einer Vergiftung mit TcdA war bei 300 µM Ax zu beobachten. Unbehandelte Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen. Bei Behandlung der Zellen nur mit Ax wurden bei 300 µM im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermehrt abgerundete Zellen beobachtet.

3.1.3 Bestimmung der mittleren effektiven Hemmkonzentration von Ax auf TcdA und TcdB

Um die mittlere effektive Hemmkonzentration (EC_{50}) zu bestimmen, wurden Vero Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (3-300 µM) an Ax inkubiert. Die Vero Zellen wurden entweder mit TcdA (5 pM) oder TcdB (10 pM) vergiftet. Anschließend wurden die Zellen lichtmikroskopisch beobachtet und die morphologischen Veränderungen fotographisch dokumentiert. Die mittlere effektive inhibitorische Konzentration wurde rechnerisch für jedem Versuch einzeln bestimmt (siehe Abbildung 12).

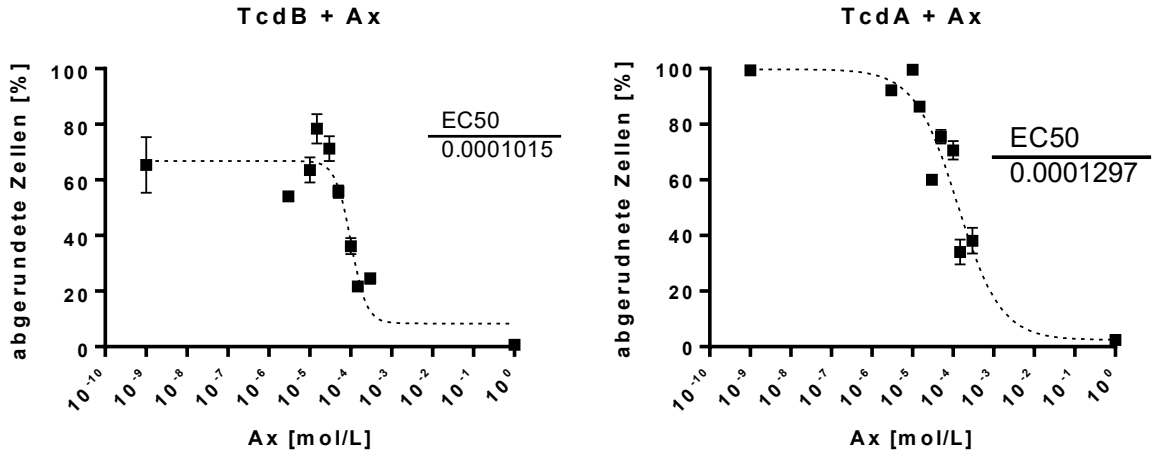


Abbildung 12: Bestimmung der mittlere effektive Hemmkonzentrationen von Ax

Es wurde die mittlere effektive inhibitorische Konzentration (EC_{50}) von Ax an Vero Zellen nach 4 h (TcdA) und nach 5 h (TcdB) untersucht und Konzentrationen von zwischen 3 µM und 300 µM Ax verwendet. Dabei wurden die Zellen mit TcdA (5pM) oder TcdB (10pM) behandelt. Die EC_{50} von Ax betrug rechnerisch bei TcdA 129,7 µM und bei TcdB 101,5 µM. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ und GraphPad (n=3).

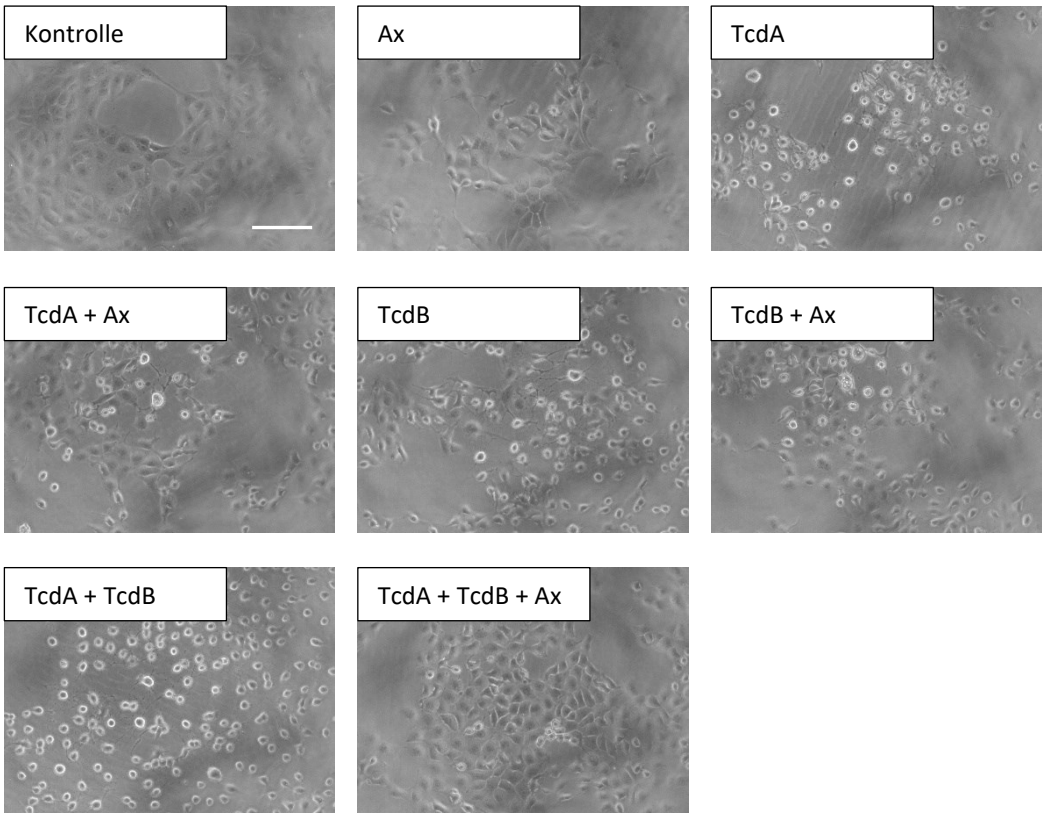
Nach 4h (TcdA) bzw. 5h (TcdB) wurden jeweils die EC_{50} für Ax rechnerisch für den jeweiligen Versuch bestimmt. Unter diesen speziellen Bedingungen lag die bestimmte EC_{50} bei 101,5µM (TcdB) bzw.129,7 µM (TcdA).

3.1.4 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen bei Kombination von TcdA und TcdB

Da von virulenten *C. Difficile* Stämmen normalerweise nicht nur ein Toxin sezerniert wird, sondern eine Kombination aus mehreren Toxinen, wurde Ax mit der klinisch relevanten Kombination aus TcdA und TcdB auf inhibitorische Effekte untersucht. Die Zellen wurden mit TcdA (10pM), TcdB (10pM) oder der Kombination beider Toxine vergiftet. Zusätzlich wurden die Zellen mit 150 µM Ax behandelt, da diese Konzentration eine Inhibition bei den einzelnen

Toxinen in vorherigen Experimenten zeigen konnte. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert und anschließend die abgerundeten Zellen gezählt und mit der Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt (siehe Abbildung 13). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und dreimal wiederholt.

A



B

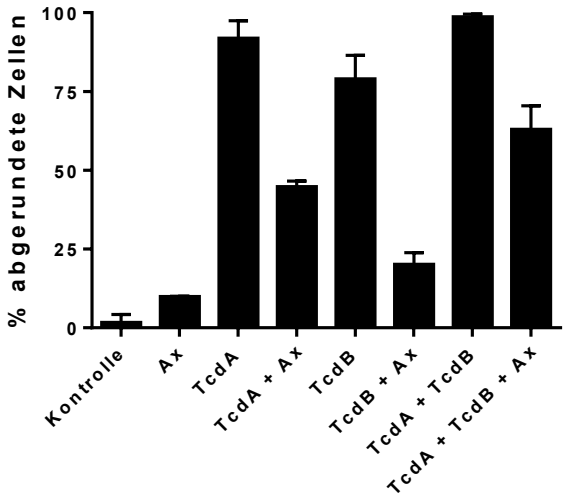


Abbildung 13: Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdA und TcdB nach 4 h

A Die Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit 10 pM TcdA, 10 pM TcdB und 150 µM Ax (Ax) über 4 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und dreimal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden stündlich lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Die abgerundeten Zellen wurden gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die Auszählung wurde mit dem Softwareprogramm ImageJ vorgenommen (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Bei der Auswertung konnte man eine deutliche Reduktion der abgerundeten Zellen nach 4 h bei zusätzlicher Behandlung mit Ax erkennen. Der inhibitorische Effekt von Ax wurde sowohl bei Inkubation mit einem Toxin als auch bei Inkubation mit der Kombination aus beiden Toxinen beobachtet. Dabei fiel der inhibitorische Effekt bei der Kombination aus TcdA/TcdB geringer aus als bei der Inkubation mit den einzelnen Toxinen. Eine geringe Anzahl an abgerundeten Zellen konnte auch bei alleiniger Inkubation von 150 µM Ax beobachtet werden. Insgesamt konnte eine inhibitorische Wirkung von Ax auf die Toxin-Kombination TcdA/TcdB festgestellt werden.

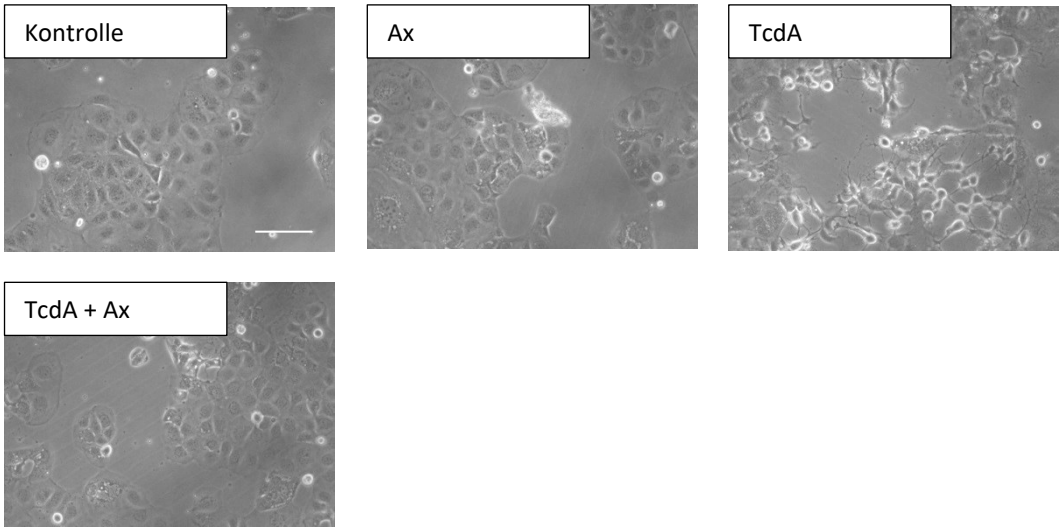
3.1.5 Reduktion von glykosyliertem Rac1 durch Ax nach Vergiftung mit TcdA oder TcdB

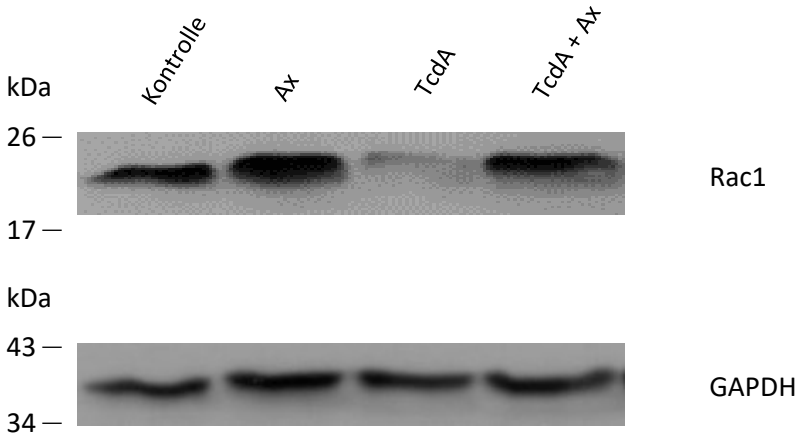
Die intrazelluläre Substartmodifikation von Rac1 durch TcdA und TcdB konnte mit einem Rac1-Antikörper analysiert werden und dadurch Schlüsse auf die Vergiftung gezogen werden. Dazu wurde zunächst ein Zytotoxizitätsversuch durchgeführt und anschließend mit Hilfe einer SDS-Page, eines Western-Blots und der Detektion von Rac1 der Glykosylierungsstatus von Rac1 analysiert. Dies basiert auf der Tatsache, dass nicht-glykosyliertes Rac1 vom Antikörper gebunden wurde, während glykosyliertes Rac1 vom Antikörper nicht mehr gebunden wurde. Dadurch lieferte der Glykosylierungsstatus von Rac1 Rückschlüsse auf die bisherige Aktivität der Glykosyltransferase von TcdA und TcdB. Eine Inhibition durch Ax würde sich durch eine stärkere Bindung des Antikörpers und entsprechend stärkeren Bandensignalen auszeichnen.

Effekt von Ax auf den Glykosylierungsstatus von Rac1 in humanen CaCo-2 Zellen nach TcdA-Vergiftung

Die Zellen wurden gleichzeitig mit TcdA und Ax behandelt und für 4 h inkubiert. Für Ax wurde eine Konzentration von 150 µM gewählt, da sich diese bei Vero Zellen als wirksame inhibitorische Konzentration erwiesen hatte. Die morphologischen Veränderungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Die Bildausschnitte wurden dabei repräsentativ für die Proben ausgewählt (siehe Abbildung 14). Anschließend wurde die Vergiftung gestoppt und nicht-glykosyliertes Rac1 durch einen Rac1-Antikörper nachgewiesen.

A





B

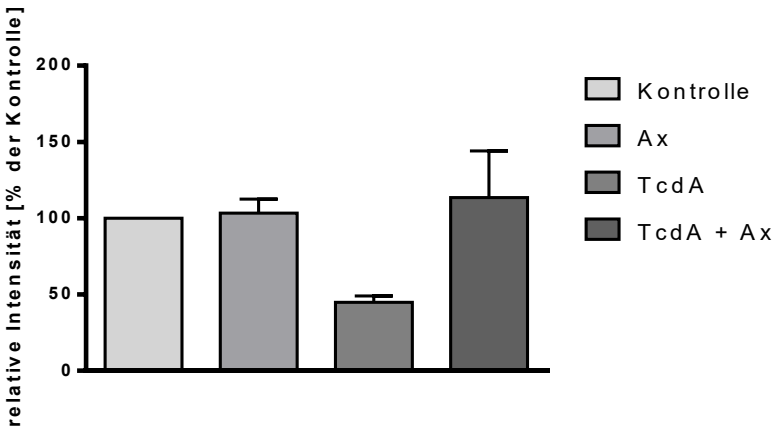


Abbildung 14: Effekt von Ax auf die Vergiftung von humanen CaCo-2 Zellen mit TcdA

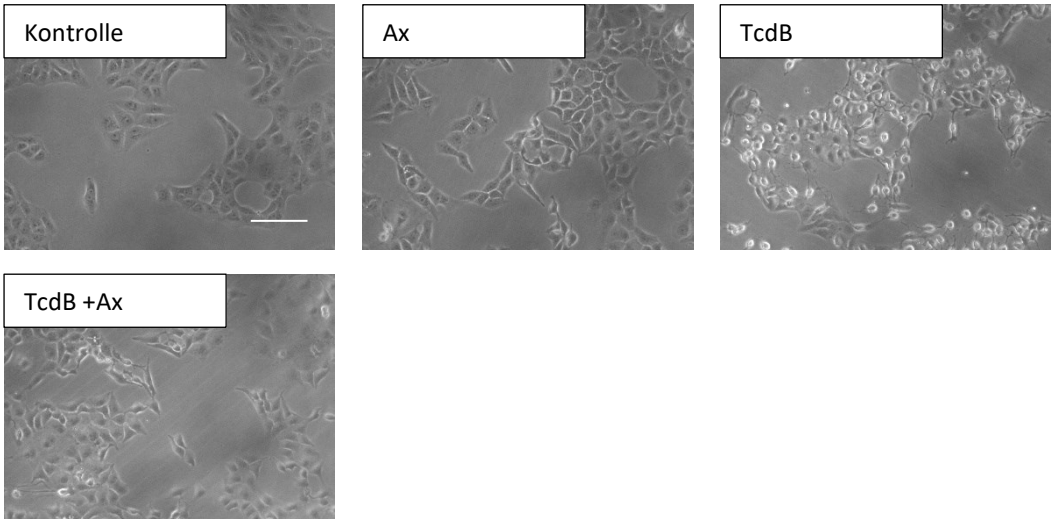
A Die CaCo-2 Zellen wurden mit 5 pM TcdA und 150 µM Ax für 4 h inkubiert. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50µm **B** Anschließend wurde die Vergiftung durch Einfrieren bei -20 °C gestoppt. Mit 50 µl 95 °C heißem 2,5-fach Laemmlipuffer wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Page wurden die Zellbestandteile aufgetrennt. Im anschließendem Western Blot wurden die Proteine auf eine Membran übertragen und mit einem Rac1-Antikörper wurde nicht-glykosyliertes Rac1 detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Während die Zellen, die nur mit TcdA behandelt wurden, starke morphologische Veränderungen nach 4h aufwiesen, zeigten die zusätzlich mit Ax behandelten Zellen weniger starke Auffälligkeiten. Die unbehandelten Zellen sowie die Kontrolle nur mit Ax wiesen keine morphologischen Vergiftungszeichen auf. In der anschließenden Bestimmung von Rac1 bestätigte sich die Vergiftung mit TcdA der CaCo-2 Zellen, da wenig nicht-glykosyliertes Rac1 nachgewiesen wurde im Vergleich zur Kontrolle. Demgegenüber zeigte sich bei der einer Vergiftung mit TcdA und Ax eine ähnlich starke Bandenintensität wie in der Kontrolle. Dies bedeutete, dass durch zusätzliche Inkubation mit Ax weniger durch TcdA glykosyliertes Rac1 bzw. mehr nicht-glykosyliertes Rac1 in den Zellen vorhanden war. Somit konnte bei Untersuchung des Glykosylierungsstatus von Rac1 ein inhibitorischer Effekt von Ax auf TcdA-vergiftete CoCo-2 Zellen gezeigt werden.

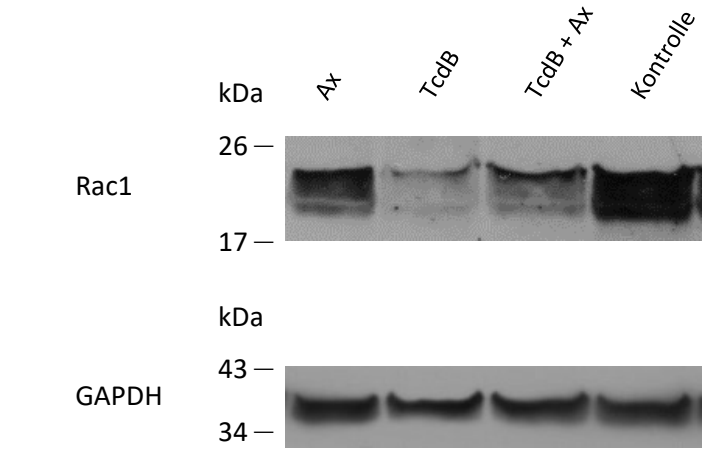
Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdB durch Nachweis von nicht-glykosyliertem Rac1

Zunächst wurde ein Zytotoxizitätsversuch mit TcdB und Ax über 4 h durchgeführt und anschließend die Vergiftung gestoppt. Die morphologischen Veränderungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert und die Bildausschnitte wurden dabei repräsentativ für den Versuch ausgewählt (siehe Abbildung 15). Im anschließenden Western Blot wurde der Glykosylierungsstatus von Rac1 der Zellen untersucht.

A



B



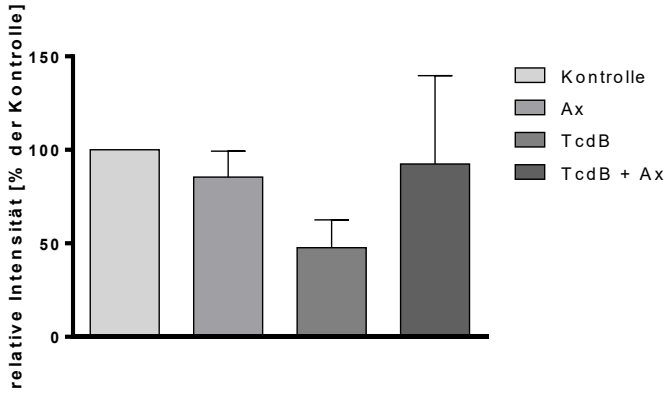


Abbildung 15: Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit TcdB durch Nachweis von Rac1

A Die Vero Zellen wurden mit 10 pM TcdB und 150µM Ax für 4 h inkubiert. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Anschließend wurde die Vergiftung durch Einfrieren bei -20 °C gestoppt. Mit 50 µl 95 °C heißem 2,5-fach Laemmlipuffer wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Page wurden die Zellbestandteile aufgetrennt. Im anschließendem Western Blot wurden die Proteine auf eine Membran übertragen und mit einem Rac1-Antikörper wurde nicht-glykosyliertes Rac1 detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (n=3). Übersetzt und bearbeitet aus [73], CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Während die Zellen, die nur mit TcdB behandelt wurden, starke morphologische Veränderungen nach 4 h aufwiesen, zeigten zusätzlich mit Ax behandelte Zellen weniger starke morphologische Veränderungen. Die unbehandelten Vero Zellen sowie die Kontrolle mit Ax wiesen keine morphologischen Vergiftungszeichen auf. Durch Bestimmung von Rac1 zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Bandenintensität im Vergleich zur Kontrolle bei TcdB-vergifteten Vero Zellen. Diese Reduktion fiel deutlich schwächer aus bei zusätzlich mit Ax behandelten Zellen. Eine alleinige Inkubation mit Ax hatte keinen Einfluss auf die Bandenintensität. Durch Bestimmung des Glykosylierungsstatus von Rac1 konnte somit ein inhibitorischer Effekt von Ax auf TcdB vergiftete Vero Zellen gezeigt werden.

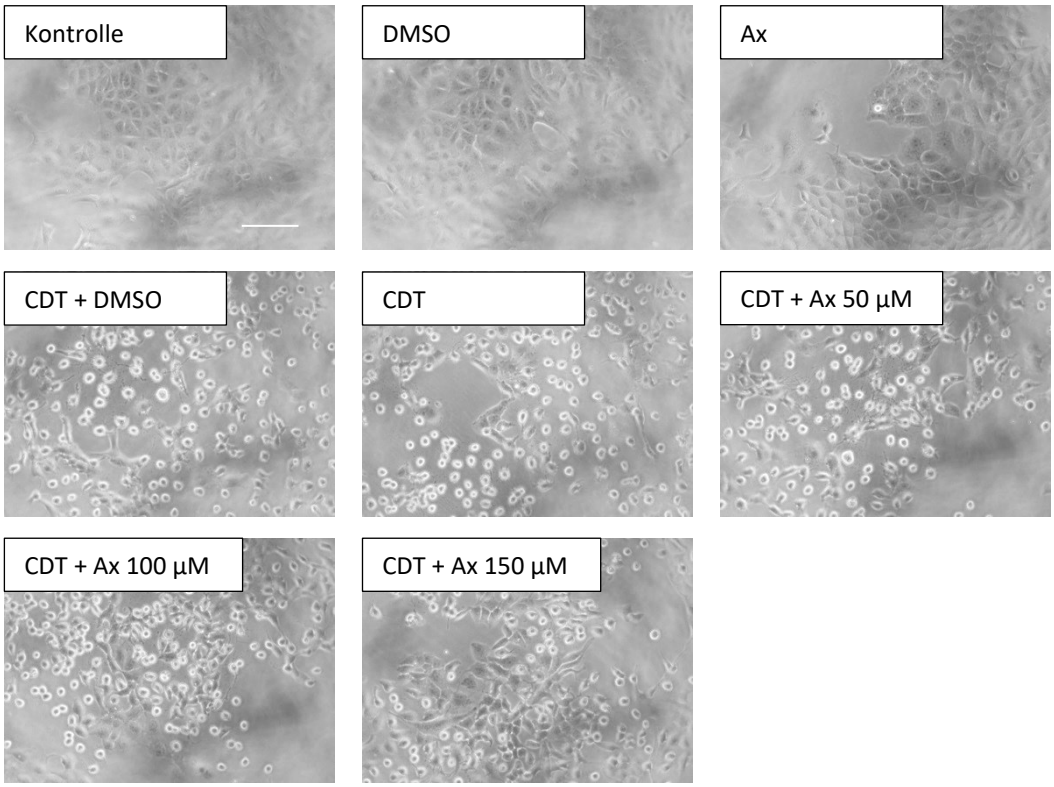
3.2 Inhibitorischer Effekt von Ax auf CDT-vergiftete Zellen

CDT ist ein Toxin, das von hypervirulenten *C. difficile* Stämmen gebildet wird. Als binäres Toxin besteht es aus den Komponenten CDTa und CDTb. Es bewirkt durch die ADP-Ribosylierung von G-Aktin eine Depolymerisation und damit verbunden Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts (siehe Einleitung).

3.2.1 Einfluss von Ax auf die Vergiftung von nicht humanen Vero Zellen mit CDT

Die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch CDT ließ sich durch das Lichtmikroskop anhand morphologischer Veränderungen der Zelle erkennen. Diese zeigten sich durch eine Abrundung der Zellen, Lösen von Zell-Zell-Kontakten und des Verlustes der Zelladhärenz. Um den Einfluss von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit 40 ng/ml CDTa und 80 ng/ml CDTb zu charakterisieren, wurden die Zellen zusätzlich mit Konzentrationen von 50 µM, 100 µM und 150 µM Ax behandelt und in Zytotoxizitätsversuchen der Verlauf lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Die Bildausschnitte wurden repräsentativ für den Versuch ausgewählt (siehe Abbildung 16).

A



B

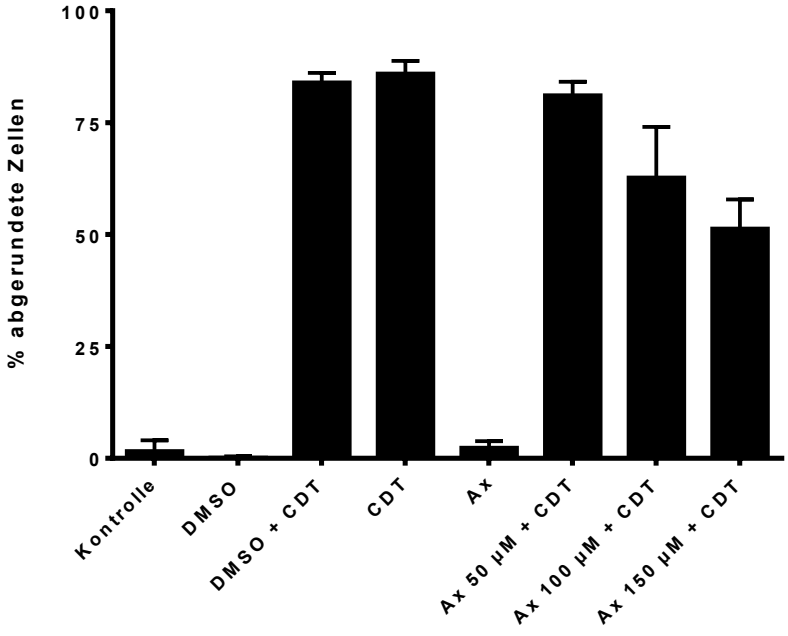


Abbildung 16: Effekt von Ax auf die Vergiftung von Vero Zellen mit CDT nach 5 h

A Die Zellen wurden mit 40/80 ng/ml Clostridium difficile Transferase (CDT) und zusätzlich mit aufsteigenden Konzentrationen an Ax (50 µM, 100 µM und 150 µM) über 5 h inkubiert. Um einen Eigeneffekt von Ax und dessen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) auszuschließen, wurden diese zusammen mit einer unbehandelten Probe als Kontrolle eingefügt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und viermal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Die abgerundeten Zellen wurden gezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die Auszählung wurde mit dem Softwareprogramm ImageJ vorgenommen (n=3).

Die CDT-vergifteten Zellen zeigten nach 5 h die typischen morphologischen Vergiftungsanzeichen wie Abrundung und Verlust der Zell-Zell-Kontakte. Durch zusätzliche Behandlung mit DMSO konnte kein Einfluss auf die Vergiftung festgestellt werden. Die Kontrollprobe, sowie nur mit Ax und DMSO behandelte Vero Zellen zeigten keine morphologischen Vergiftungsanzeichen. Ein inhibitorischer Effekt von Ax auf CDT- vergiftete Zellen wurde bei einer Konzentration von 100 µM und 150 µM beobachtet. Die vergifteten Vero Zellen zeigten eine leichte Reduktion der Anzahl abgerundeter Zellen bei zusätzlicher Behandlung mit 100 µM und 150 µM Ax. Bei 50 µM Ax war dieser Effekt nicht zu beobachten. Ein inhibitorischer Effekt von Ax auf CDT konnte somit nur bei 100 µM oder höheren Konzentrationen festgestellt werden.

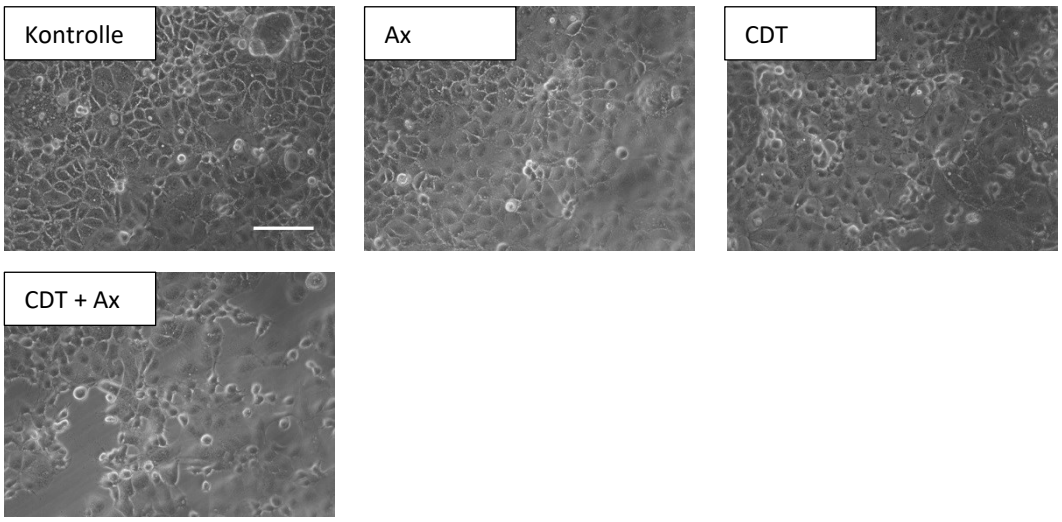
3.2.2 Einfluss von Ax auf die Vergiftung humaner Dickdarmepithelzellen mit CDT

Um den Einfluss von Ax auf die CDT-Vergiftung von humanen Dickdarmepithelzellen zu untersuchen, wurde die CaCo-2 Zelllinie verwendet. Als humane Dickdarmzelllinie zeichnet sich diese durch eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen aus.

Effekt von Ax auf die Vergiftung von CaCo-2 Zellen mit CDT

CDT entfaltet seine pathogene Wirkung in CaCo-2 Zellen durch eine ADP-Ribosylierung von G-Aktin. Durch eine anschließende ADP-Nachribosylierung mit Biotin-markiertem NAD^+ konnte noch nicht modifiziertes G-Aktin detektiert und Rückschlüsse auf den ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin in den Zellen gezogen werden. Dazu wurde zunächst ein Zytotoxizitätsversuch mit CDT und Ax durchgeführt. Die Effekte wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Die Bildausschnitte wurden repräsentativ für den Versuch ausgewählt (siehe Abbildung 17 A). Anschließend wurde der ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin bestimmt (siehe Abbildung 17 B).

A



B

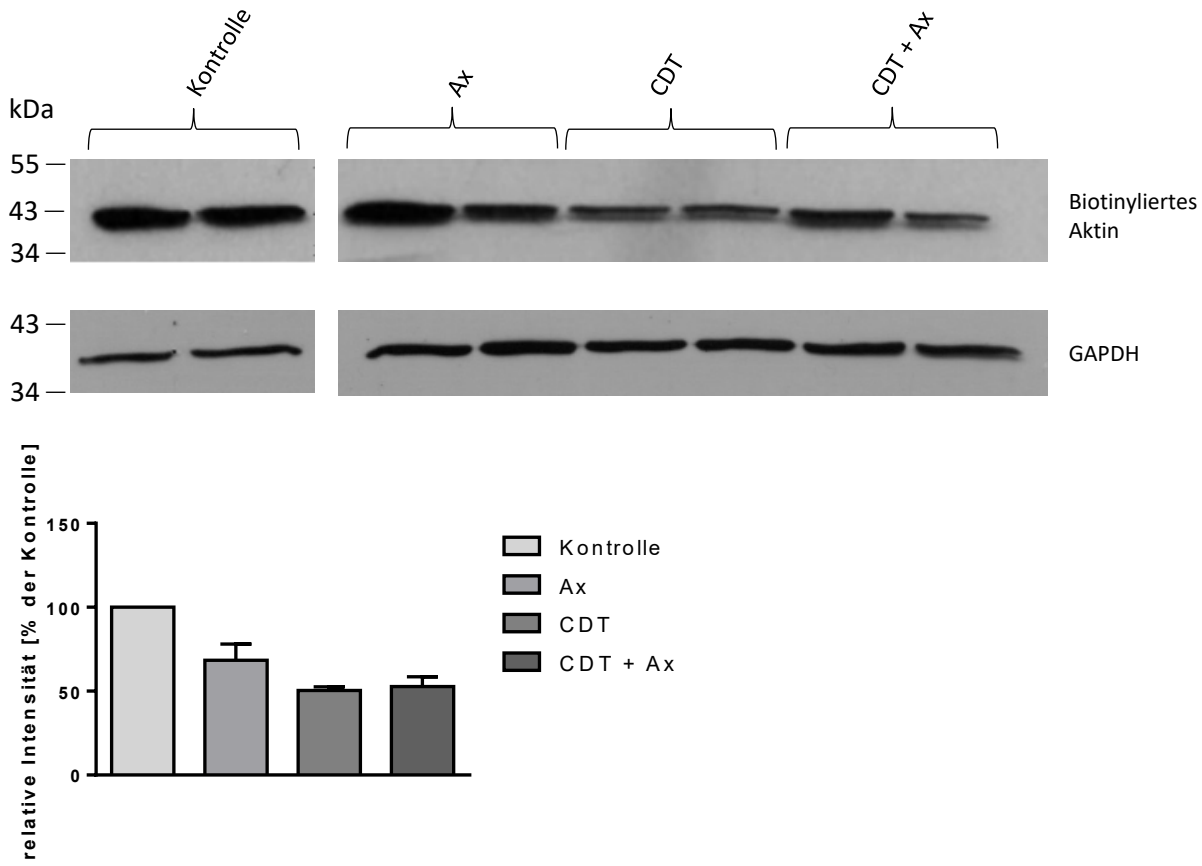


Abbildung 17: Effekt von Ax auf die ADP-Nachribosylierung von CDT-vergifteten CaCo-2 Zellen nach 5h

A In einem Zytotoxizitätsversuch wurden CaCo-2 Zellen mit 50/100 ng/ml Clostridium difficile Transferase (CDT) sowie 150 µM Ax inkubiert. Der Versuch wurde in Duplets durchgeführt und dreimal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Durch Einfrieren mit 50 µl ADP-Ribosylierungspuffer bei -20 °C für 1 h wurde die Vergiftung gestoppt und die Zellen lysiert. Danach wurden die Zellen mit 100 ng CDTa unter Anwesenheit von 1 µl Biotin—markiertem NAD^+ inkubiert. Anschließend wurde das mit Biotin markierte und ADP—ribosylierte Aktin der lysierten Zellen mit Streptavidin—Peroxidase (Strep-POD) detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (n=3).

Es zeigten sich nach 5 h sichtbare morphologische Veränderungen der Zellen, die mit CDT sowie zusätzlich mit Ax behandelt wurden. In den Kontrollen waren keine Vergiftungsanzeichen sichtbar. Anschließend wurde der ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin der CaCo-2 Zellen bestimmt. Die Banden von Ax und der Kontrolle zeigten eine ähliche Intensität. Ein Eigeneffekt von Ax auf den ADP-Ribosylierungsstatus war nicht zu erkennen. Dagegen wurde bei den mit CDT-vergifteten Zellen eine Reduktion der Bandenintensität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Dies sprach für eine geringen Bestandteil an Biotin-makiertem Aktin, welches in der ADP-Nachribosylierung umgesetzt werden konnte. Mit CDT und Ax behandelte Zellen zeigten ein ähnliche Bandenintensität bei der Detektion. Bei der Bestimmung der Bandenintensität konnte kein Unterschied bei einer zusätzlichen Behandlung mit Ax bei CDT-vergifteten Zellen festgestellt werden. Dies bedeutete, dass keine inhibitorische Wirkung von Ax auf CaCo-2 Zellen bei Auswertung des ADP-Ribosylierungsstatuses von G-Aktin nach 5 h festgestellt werden konnte.

Einfluss von Ax und CDT auf den transepithelialen Widerstand eines CaCo-2 Monolayers

Da sich die Beobachtung morphologischer Veränderungen mit dem Lichtmikroskop bei humanen CaCo-2 Zellen als schwierig erwies und keine inhibitorische Wirkung von Ax auf den ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin in CaCo-2 Zellen gezeigt werden konnte, wurde als weitere Methode ein TEER-Assay durchgeführt. Dabei wurde der transepitheliale Widerstand eines aus CaCo-2 Zellen bestehenden Monolayers über einen 6-stündigen Zeitraum gemessen. Die gemessenen Werte wurden verglichen und gaben Auskunft über die Integrität des CaCo-2 Monolayers und damit über die Barrierefunktion der Epithelzellen. Da die Toxine von *C. difficile* ihre pathogene Wirkung über eine Störung der Darmbarriere erreichen, wurde der Versuch benutzt, um ein besseres Verständnis der Wirkung von CDT und Ax auf die Barrierefunktion von humanen Darmepithelzellen zu erlangen (siehe Abbildung 18).

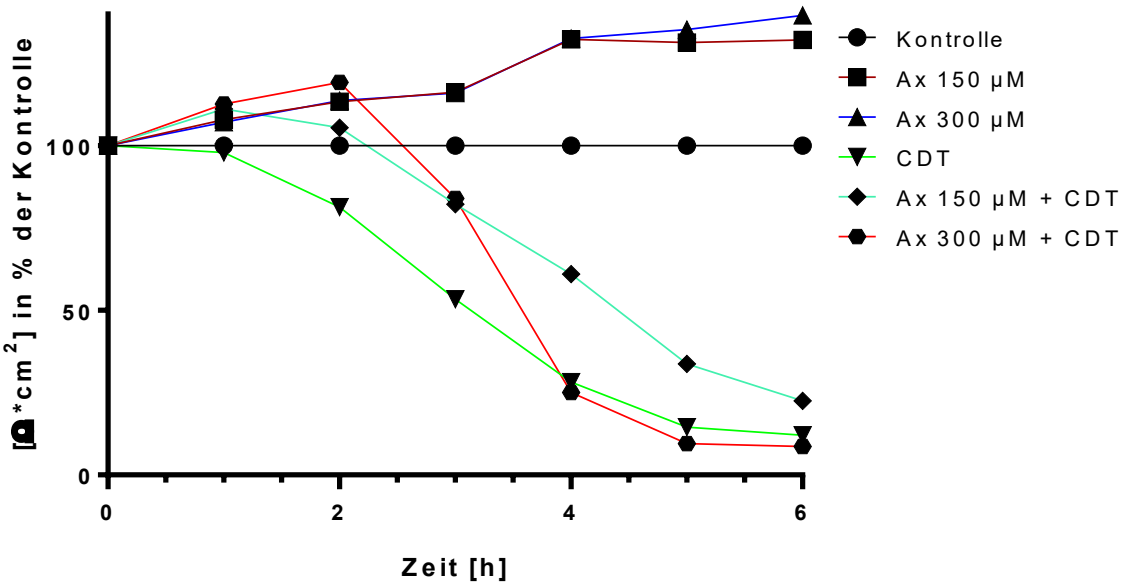


Abbildung 18: Effekt von CDT und Ax auf den transepithelialen Widerstands von CaCo-2 Zellen

Die CaCo-2 Zellen wurden auf einem Filter ausgesät und 3-4 Tage im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 75/150 ng/ml Clostridium difficile Transferase (CDT) und Ax (150 µM, 300 µM) über 6 h inkubiert. Dabei wurde der elektrische Widerstand des CaCo-2 Monolayers zu definierten Zeitpunkten gemessen. Die Messungen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism 6 auf die Kontrolle genormt (n=2).

Die gemessenen Werte im TEER-Assay wurden auf die Kontrolle genormt. Der transepitheliale Widerstand der beiden Kontrollgruppen, die mit Ax behandelt wurden, zeigte im Vergleich zur Kontrolle der unbehandelten Zellen ein Anstieg des transepithelialen Widerstands. Dadurch konnte davon ausgegangen werden, dass Ax keinen negativen Effekt auf die Integrität des CaCo-2 Monolayers hatte. CDT-vergiftete Zellen zeigten dagegen einen kontinuierlichen Abfall des transepithlialen Widerstands und einen damit verbundenen Verlust der Barrierefunktion des CaCo-2 Monolayers. Bei gemeinsamer Inkubation von CDT und Ax zeigte sich ein biphasischer Verlauf mit einem Anstieg und einem Abfall des transepithelialen Widerstands. Bis 2 h nach Versuchsbeginn wurde ein Anstieg des transepithelialen Widerstands im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, welcher dem der Ax-Kontrollen ähnelte. Nach 2 h wurde ein starker Abfall des transepithelialen Widerstands in den Messungen beobachtet. Bei 300 µM war der Abfall des transepithelialen Widerstands bei CDT und Ax behandelten Zellen stärker ausgeprägt als bei 150 µM. Jedoch konnte ein inhibitorischer Effekt von Ax bis 3 h nach Versuchsbeginn bei beiden eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden und zusätzlich konnte ein Unterschied im transepithelialen Widerstand zwischen CDT-vergifteten Zellen und mit 150 µM Ax behandelten Zellen über 6 h beobachtet werden. Nach 6 h zeigte sich eine

Plateauphase bei CDT und CDT + Ax 300 µM. Ax zeigte bei CDT-Vergiftung eine schützende Wirkung auf einen CaCo-2 Monolayer in einem TEER-Assay.

3.2.3 Der Effekt von Ax auf die Enzymaktivität von CDTa

Bei der *in vitro* Enzymaktivität von CDTa wurde der ADP-Ribosylierungstatus von G-Aktin in Vero Zellysat untersucht. Biotin-markiertes NAD^+ diente dabei als Kofaktor für CDTa. Durch zusätzliche Inkubation mit Ax wurde dessen Effekt auf die Enzymaktivität von CDTa untersucht. Dabei wurde das gleiche Konzentrationsverhältnis von Ax zu CDTa wie in den Zytotoxizitätsversuchen geschaffen (siehe Abbildung 19 A1+A2). In einem weiteren Versuch wurde die *in vitro* Enzymaktivität von CDTa mit höheren Konzentrationen von Ax untersucht, um mögliche Konzentrationsabhängige Effekte aufzudecken (siehe Abbildung 19 B1+B2).

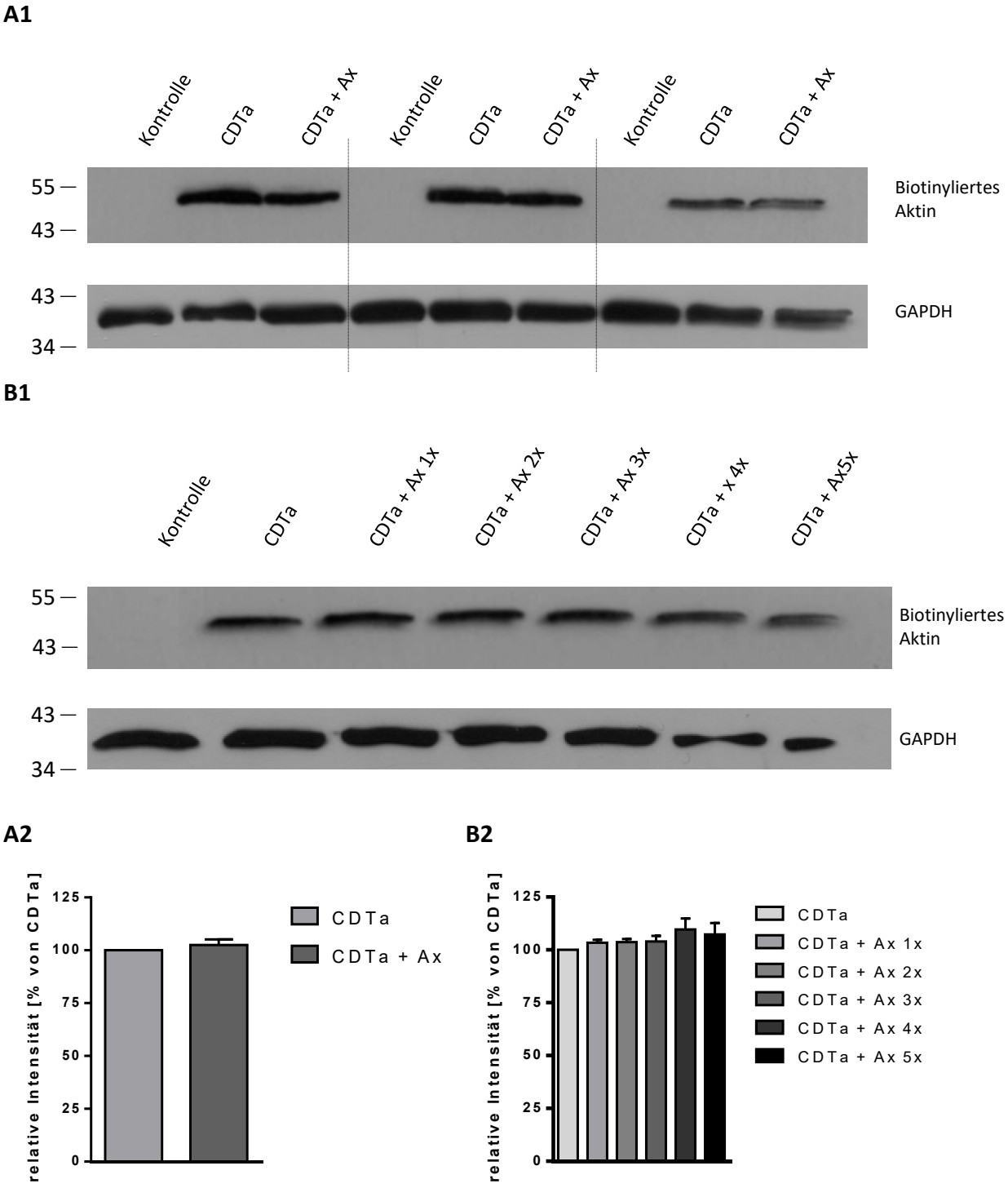


Abbildung 19: Der Effekt von Ax auf die Enzymaktivität von CDTa

A1 Der Effekt von Ax auf die Komponente CDTa wurde durch Bestimmung der *in vitro* Enzymaktivität von CDTa untersucht. Dazu wurde Vero Zelllysat mit 100 ng CDTa sowie 150 µM Ax unter Anwesenheit von 1 µl Biotin—markiertem NAD^+ inkubiert. Anschließend wurde das mit Biotin-markierte und ADP—ribosylierte Aktin der lysierten Zellen mit Strep-POD detektiert. Der Versuch wurde als Triplikate durchgeführt und werden zur besseren Übersicht durch Striche getrennt. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (n=3). **B1** Die *in vitro* Enzymaktivität von CDTa wurde anschließend mit ansteigenden Konzentrationen an Ax wiederholt. Dazu wurde ein jeweils Vielfaches von 150 µM Ax (1 bis 5-fache Konzentration) für die Messung der *in vitro* Enzymaktivität genutzt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH (n=3). **A2** Vergleich der relativen Intensitäten genormt auf CDTa bei 150µM Ax (n=3). **B2** Vergleich der relativen Intensitäten genormt auf CDTa mit ansteigenden Konzentrationen von Ax (n=3).

In der Kontrolle zeigte sich keine Bande, da kein Biotin- makiertes NAD^+ umgesetzt wurde. Die Bandenintensität von CDTa und CDTa mit Ax unterschieden sich nicht. Dies bedeutet, das gleich viel Biotin- makiertes NAD^+ in den Proben umgesetzt wurde und somit Ax keinen Einfluss auf die *in vitro* Enzymaktivität von CDTa zeigte. Im zweiten Teil des Versuches wurden höhere Konzentration an Ax auf die *in vitro* Enzymaktivität von CDTa untersucht. Auch hier konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Bandenintensität festgestellt werden. Lediglich bei der höchsten Konzentration an Ax (5x) zeigte sich ein Abbruch der Bande. Bei einem Vergleich mit der GAPDH-Ladekontrolle wurde ebenfalls ein Abbruch der Bande festgestellt und dieser als Artefakt behandelt. Ein Einfluss von Ax auf die Enzymaktivität von CDTa konnte auch bei höheren Konzentrationen nicht beobachtet werden.

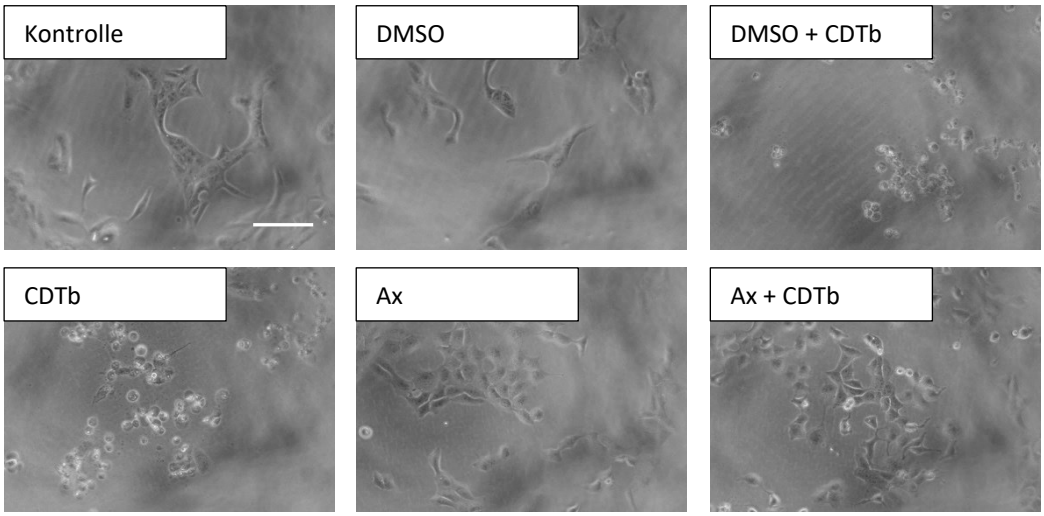
3.3 Einfluss von Ax auf CDTb und dessen zytotoxischen Eigeneffekt in Zellversuchen

In der AG Barth konnte gezeigt werden, dass CDTb in hohen Konzentrationen einen zytotoxischen Eigeneffekt auf Zellen hatte, ohne dass dafür die enzymatische Komponente CDTa präsent sein musste (siehe Einleitung). Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob Ax ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf den zytotoxischen CDTb-Eigeneffekt hat welchen einen Einfluss Ax auf die Bindung der CDTb-Komponente hat.

3.3.1 Effekt von Ax auf die Behandlung von Vero Zellen mit CDTb

Um einen ersten Eindruck zu erhalten welchen Einfluss Ax auf den CDTb-Effekt hat, wurden Vero Zellen mit 500 ng/ml CDTb in An- und Abwesenheit von 150 µM Ax über 6 h inkubiert und mittels Lichtmikroskop beobachtet und fotographisch dokumentiert (siehe Abbildung 20 A). Anschließend wurde die Zellviabilität der Vero Zellen nach 6,25 h gemessen (siehe Abbildung 20 B).

A



B

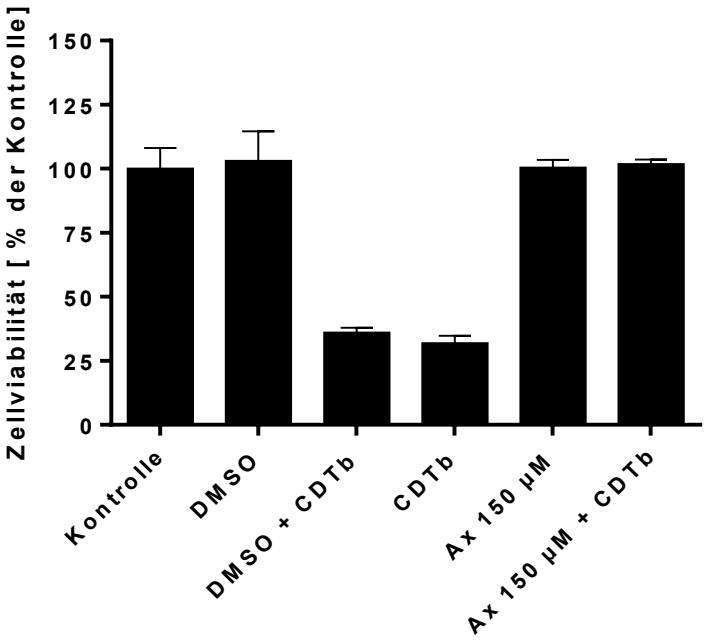


Abbildung 20: Effekt von Ax auf die Zellviablität von Vero Zellen mit CDTb nach 6,25 h

A Die Zellen wurden mit 500 ng/ml CDTb und zusätzlich mit 150 µM Ax für 6,25 h inkubiert. Um einen Eigeneffekt von Ax und dessen Lösungsmittel DMSO auszuschließen, wurden diese zusammen mit unbehandelten Zellen als Kontrolle eingefügt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Maßstabsbalken = 50 µm **B** Anschließend wurden die Zellen jeweils für eine 1 h mit 10 µl MTS-Reagenz pro *Well* inkubiert und mit Hilfe des *E340 microplate reader* wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm der Farbumschlag gemessen. Die Zellviabilität wurde auf die Kontrolle genormt (n=3).

Die mit CDTb behandelten Zellen zeigten nach 6,25 h eine veränderte Zellmorphologie mit aufgedunsenen und abgerundeten Zellen. Dabei hatte eine Inkubation mit DMSO keinen Einfluss auf die Vergiftung und auch keinen Einfluss auf unbehandelte Zellen. Eine zusätzliche

Inkubation der Zellen mit 150 µM Ax konnte die CDTb-verursachten morphologischen Veränderungen fast vollständig verhindern.

Bei Messung der Zellviabilität wurde ebenfalls ein inhibitorischer Effekt von Ax auf die zytotoxische Wirkung von CDTb beobachtet. Dabei zeigte die Vergiftung mit CDTb eine starke Reduktion der Zellviabilität nach 6,25 h. Ein Effekt von DMSO auf die Vergiftung wurde nicht nachgewiesen. Eine zusätzliche Inkubation von CDTb-vergifteten Zellen mit Ax zeigte hingegen keinen Abfall der Zellviabilität. Es wurde eine vollständige Inhibition des zytotoxischen CDTb Effekts durch 150 µM Ax nach 6,25 h gezeigt.

Um zu klären ab welcher Konzentration sich ein inhibitorischer Effekt von Ax auf den CDTb-Effekt zeigt und ob dieser auch über einen längeren Zeitraum als 6,25 h präsent ist, wurden Vero Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Ax über 26 h inkubiert (siehe Abbildung 21).

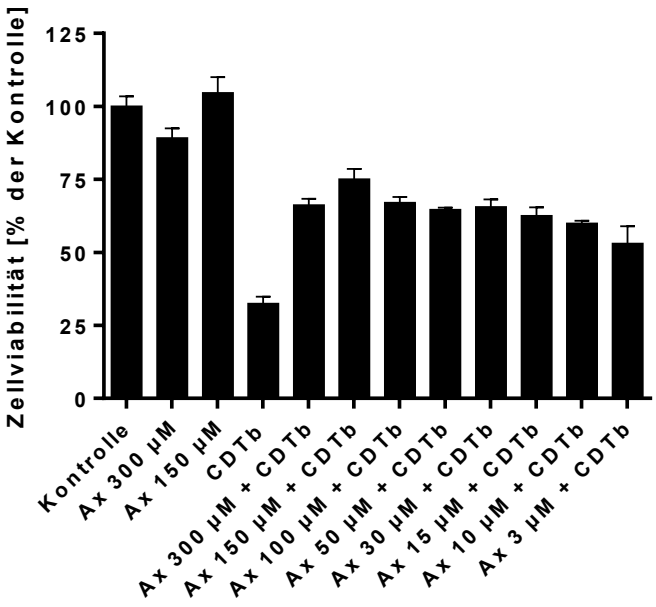


Abbildung 21: Effekt von Ax auf die Zellviablität von Vero Zellen mit CDTb nach 26 h

Die Vero Zellen wurden mit 500 ng/ml CDTb sowie verschiedenen Konzentrationen an Ax (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) über 26 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die nur mit 150 µM und 300 µM Ax inkubiert wurden zur Überprüfung eines Eigeneffektes von Ax. Nach 26 h wurden die Zellen jeweils für eine 1 h mit 10 µl MTS-Reagenz pro *Well* inkubiert und anschließend wurde im *E340 microplate reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm der Farbumschlag gemessen. Die Zellviabilität wurde auf die Kontrolle genormt (n=3).

Eine schützende Wirkung von Ax auf CDTb-vergiftete Zellen zeigte sich noch nach 26 h. Ein inhibitorischer Einfluss wurde schon bei der Zugabe von 3 µM Ax erreicht und zeigte sich in einer erhöhten Zellviabilität im Vergleich zu den vergifteten Zellen. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde allerdings nach 26 h eine leichte Reduktion der Zellviabilität, der

mit Ax und CDTb behandelten Zellen, sichtbar. Die hemmende Wirkung von Ax war bei einer Konzentration von 150 µM am größten. Bei höheren Konzentrationen war eine Reduktion der Zellviabilität messbar. Ein inhibitorischer Effekt von Ax auf den zytotoxischen CDTb-Eigeneffekt konnte über 26 h bei den untersuchten Konzentrationen (3-300 µM) beobachtet werden.

3.3.2 Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb an Vero Zellen

Um die Ursache für die fast vollständige Inhibition von Ax auf CDTb-vergiftete Vero Zellen weiter im Detail zu analysieren, wurde der Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb an Vero Zellen untersucht. Durch die Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkiertem CDTb-488 bei 4 °C wurde eine Bindung von CDTb an den Oberflächenrezeptor ohne anschließende Aufnahme in die Zelle und ohne biochemische Veränderungen auf der Zellmembran erreicht. Durch die Zugabe von 150 µM Ax wurde das Bindungsverhalten von CDTb an den Rezeptor mit und ohne Ax verglichen. Die Auswertung erfolgte über eine Detektion der Signalintensitäten im *flow sorter* (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) und wird in Abbildung 22 dargestellt.

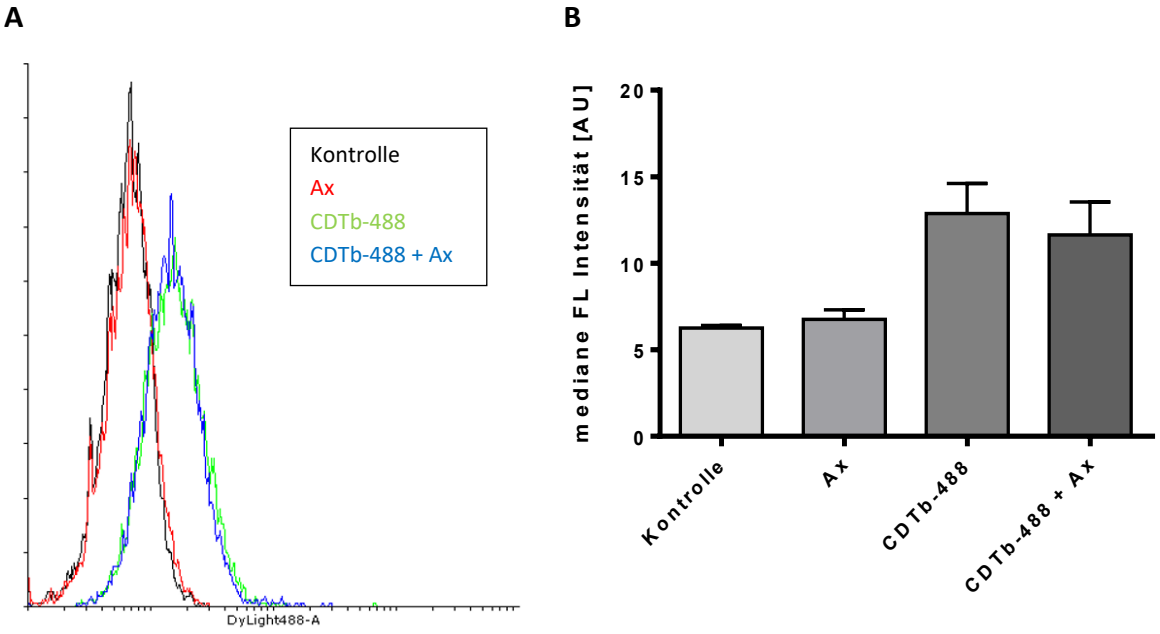


Abbildung 22: Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb-488 an Vero Zellen

Vero Zellen wurde bei 4 °C mit 2,4 ng/ml CDTb-488 sowie mit und ohne Ax (150 µM) behandelt. Durch die Behandlung bei 4 °C wurde sichergestellt, dass CDTb-488 an die Zellen nur bindet und nicht aufgenommen wurde. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und nur mit Ax behandelte Zellen. **A** Durch Messung der Fluoreszenz bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm wurde das Bindungsverhalten von CDTb-488 auf Vero Zellen mit und ohne Ax gezeigt. Dies wurde in einem Histogramm dargestellt. **B** Zur weiteren Analyse wurde die mediane Fluoreszenz Intensität der Proben miteinander verglichen und graphisch dargestellt (n=4).

Im FACS wurden die verschiedenen Proben hinsichtlich ihrer Signalintensitäten verglichen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen, die nur mit Ax behandelt wurden. Ax zeigte dabei keinen Einfluss auf die Signalintensität, da die mediane Fluoreszenzintensität den gleichen Verlauf wie bei unbehandelten Zellen zeigte. Bei der Detektion von CDTb-488 zeigten zuvor zusätzlich mit Ax behandelten, CDT-vergiftete Zellen keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zu CDT-vergifteten Zellen. Somit konnte kein Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb-488 an den Oberflächenrezeptor festgestellt werden.

3.4 Ausschluss eines möglichen Eigeneffektes von Ax

Um Eigeneffekte von Ax auf die Zellen aufzudecken, wurde in den einzelnen Versuchen eine Kontrolle mit Ax in der jeweiligen Höchstkonzentration eingesetzt. Um dies zu verifizieren, wurde in einem weiteren Experiment der Effekt von unterschiedlichen Ax-Konzentrationen (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) auf Vero Zellen untersucht. Dazu wurden die morphologischen Veränderungen im Lichtmikroskop dokumentiert sowie die Zellviabilität der Vero Zellen nach 24 h untersucht (siehe Abbildung 23a und Abbildung 23b).

A

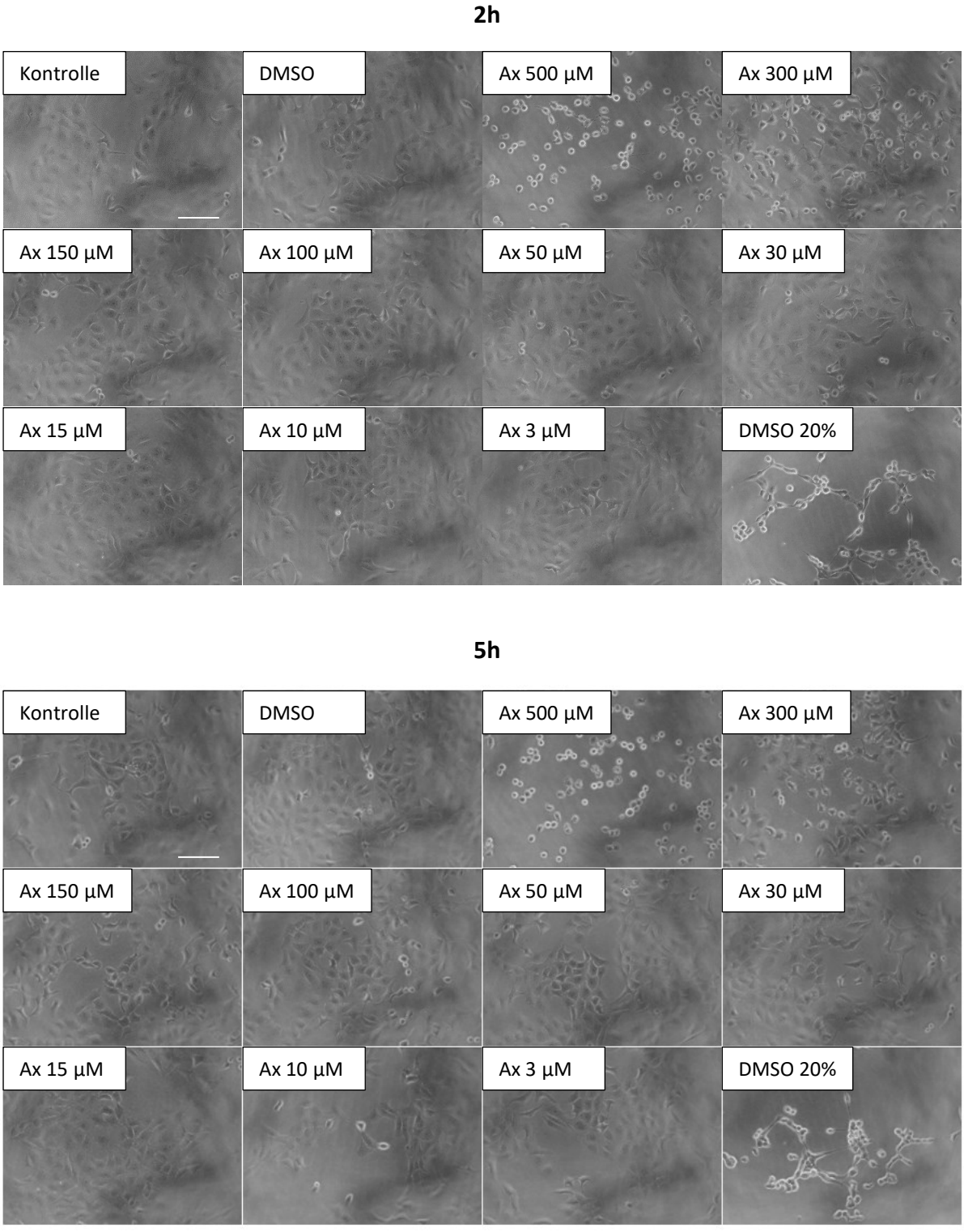
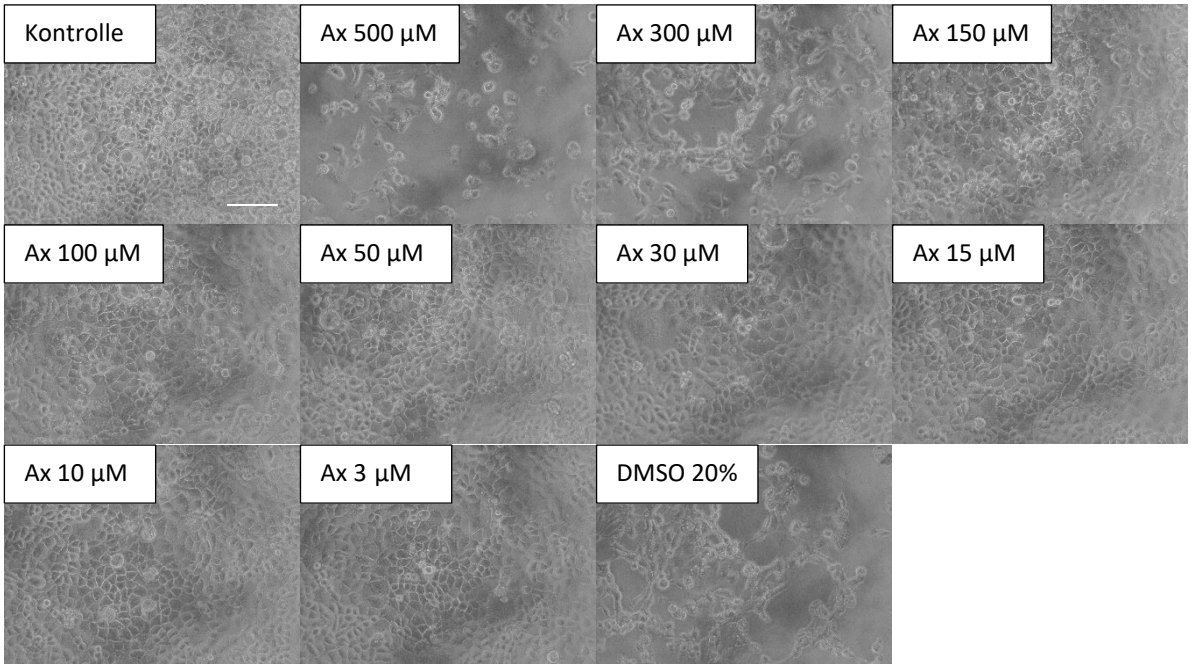


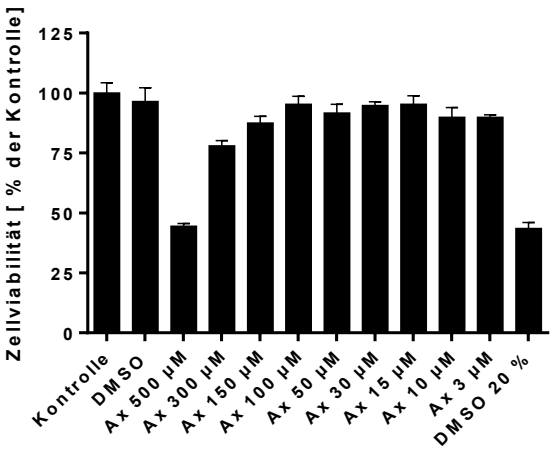
Abbildung 23a: Effekt von Ax konzentrationsabhängig auf die Zellviabilität von Vero und CaCo-2 Zellen

A Vero Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Ax (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) über 5 h inkubiert. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert zu den Zeitpunkten 2 h und 5 h. Eine 20 %ige DMSO Lösung diente als Positivkontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet.

B



C Vero



D CaCo-2

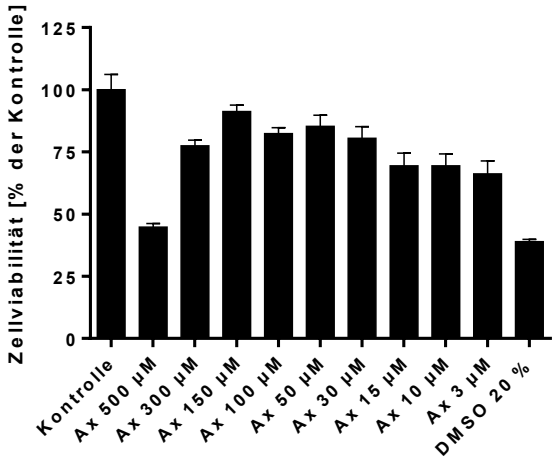


Abbildung 23b: Effekt von Ax konzentrationsabhängig auf die Zellviabilität von Vero und CaCo-2 Zellen

B CaCo-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Ax (3 µM, 10 µM, 15 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM und 300 µM) über 26 h inkubiert. Die gemachten Beobachtungen wurden lichtmikroskopisch beobachtet und fotographisch dokumentiert. Eine 20 %ige DMSO Lösung diente als Positivkontrolle. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. **C** Nach 24 h wurden die Vero Zellen jeweils für eine 1 h mit 10 µl MTS-Reagenz pro *Well* inkubiert und anschließend der Farbumschlag im *E340 microplate reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Zellviabilität wurde auf die Kontrolle genormt. **D** Nach 26 h wurden die CaCo-2 Zellen jeweils für eine 1 h mit 10 µl MTS-Reagenz pro *Well* inkubiert und anschließend der Farbumschlag im *E340 microplate reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Zellviabilität wurde auf die Kontrolle genormt (n=3).

Im Lichtmikroskop wurden die Vero Zellen nach 2 h und 5 h fotographisch dokumentiert und verglichen. Es zeigten sich dabei Veränderungen der Zellen bei Konzentrationen über 150 µM.

So präsentierten sich die Vero Zellen bei 500 µM Ax als abgerundete Zellen und bei 300 µM zeigten die Zellen einen *Halo*, was auf ein Abheben der Zellen hindeutet. Insgesamt zeigte sich nach 5 h eine reduzierte Zellanzahl im Vergleich zur Kontrolle und Zellen, die mit <300 µM Ax behandelt wurden.

Die Zellviabilität der Vero Zellen zeigte keine Unterschiede in den Werten bis zu einer Konzentration von 100 µM Ax im Vergleich zur Kontrolle. Bei 150 µM und 300 µM Ax wurde eine leichte Reduktion der Zellviabilität festgestellt. Bei 500 µM Ax zeigten sich die Zellen wie in der Positivkontrolle (20% DMSO) und hatten damit keinen Zellstoffwechsel mehr vorzuweisen. Zusammenfassend deutete dies auf einen leichten konzentrationsabhängigen Eigeneffekt von Ax hin, der bei Vero Zellen ab 150 µM in Erscheinung tritt und bei Werten >300 µM zum Zelluntergang führt.

Bei CaCo-2 Zellen wurde die Zellviabilität nach 26 h überprüft. Dabei zeigten Zellen, die mit Ax behandelt wurden, eine leichte Reduktion in der Zellviabilität. Wie bei Vero Zellen wurde eine Abnahme der Zellviabilität der CaCo-2 Zellen bei höheren Konzentrationen als 150 µM beobachtet. Bei 500 µM Ax kam es zum Untergang der CaCo-2 Zellen, da diese eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Zellviabilität vorzuweisen hatten. Eine mit der Kontrolle vergleichbare Zellviabilität wurde bei Einsatz von 150 µM Ax erreicht. Bei kleineren Konzentrationen nahm die Zellviabilität leicht ab.

4 Diskussion

Durch den Anstieg an Fällen mit insbesondere schweren Verläufen von CDIs in Krankenhäusern und medizinischen Einrichtung werden therapeutische Alternativen und Ergänzungen bei der Behandlung von CDIs gesucht. Da die Toxine von *C. difficile* die auslösenden Faktoren der Erkrankung darstellen, wird vermehrt nach Möglichkeiten zur direkten Elimination der Toxine gesucht. Zu diesem Zwecke wurde das Expektorans Ax auf seine inhibitorische Wirkung gegenüber den Toxinen TcdA, TcdB und CDT von *C. difficile* untersucht.

Der hemmende Effekt von Ax auf TcdA und TcdB

Als große clostridiale glykosylierende Toxine sind TcdA und TcdB durch Glykosylierung in der Lage, wichtige Rho Proteine zu inaktivieren. Als Folge kommt es zu Veränderungen im Aktin Zytoskelett sowie Störung weiterer Rho-abhängiger Prozesse wie Entzündung, Apoptose und Lösung von Zell-Zell Kontakten [3]. Die Übereinstimmung von TcdA und TcdB in der Aminosäuresequenz ist mit 63% hoch und erklärt viele Gemeinsamkeiten der Toxine bei der Aufnahme und Wirkung [162]. TcdA und TcdB sind die wichtigsten Virulenzfaktoren von *C. difficile* und damit auch einer der Hauptauslöser von nosokomialen Infektionen und Antibiotika-assoziierten Diarrhöen [102]. Dabei sind ausschließlich Toxine für die klinischen Symptome einer CDI verantwortlich und neue Strategien zur Milderung der Symptome durch Inhibition der Toxine werden gesucht [26]. Stoffe, die ein geringes oder bekanntes Nebenwirkungspotenzial besitzen, stehen bei der Suche nach neuen Therapeutika im Fokus. Alte Medikamente, wie z.B. Bacitracin, Chloroquin sowie körpereigene Stoffe, wie z.B. α-Defensine zeigten bereits inhibitorische Wirkung auf clostridiale Toxine [48, 146, 176, 89, 47]. Ax ist ein zugelassenes und etabliertes Medikament mit einem geringen Nebenwirkungspotenzial und zeigt Eigenschaften, welche Auswirkungen auf clostridiale Toxine haben könnte.

Ax wurde im Rahmen dieser Arbeit auf TcdA und TcdB vergiftete Vero Zellen und CaCo-2 Zellen getestet. Als etablierte Zelllinie konnten bei Vero Zellen morphologische Veränderungen leicht überwacht werden und ein spezifischer, etablierter und sehr sensitiver Endpunkt der Vergiftung festgelegt werden. Dadurch konnten die lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen an Vero Zellen verfolgt werden. Da die Toxine von *C. difficile* hauptsächlich im Dickdarm sezerniert werden, eignete sich die humane Dickdarmzelllinie der

CaCo-2 Zellen besonders gut, um die Wirkung der Toxine und des Inhibitors zu untersuchen. An humanen CaCo-2 Zellen wurden vor allem intrazellulär stattfindende Substratmodifikationen untersucht.

TcdA und TcdB vergiftete Vero Zellen zeigten weniger morphologische Veränderungen bei zusätzlicher Gabe von Ax [73]. Auf molekularer Ebene konnte durch die Untersuchung von Rac1, einem Substrat der Glykosyltransferase von TcdA und TcdB, ein inhibitorischer Effekt von Ax auf die Toxine präsentiert werden. Dies zeigte sich durch einen erhöhten Anteil an nicht-glykosyliertem Rac1 in TcdA/TcdB- vergifteten Zellen bei Anwesenheit von Ax, da durch die Hemmung die Glykosyltransferase weniger glykosyliertes Rac1 umsetzten konnte. Eine Hemmung wurde für TcdA bei CaCo-2 Zellen und für TcdB bei Vero Zellen gezeigt [73]. Insgesamt konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition von TcdA und TcdB durch Ax im Bereich zwischen 50 µM und 300 µM gezeigt werden [73]. Niedrigerer Konzentrationen an Ax schienen keinen Effekt zu haben und höhere Konzentrationen führten bei Vero Zellen zur Abrundung der Zellen und zum Zelluntergang. Ein leichter Eigeneffekt von Ax wurde auch in separaten Versuchen ab 150 µM beobachtet. Eine Inhibition der klinisch relevanten Kombination aus TcdA und TcdB konnte ebenfalls in Zytotoxizitätsversuchen gezeigt werden [73].

Verschiedenste Mechanismen zur Inhibition von TcdA und TcdB sind bekannt. Eine fehlende Absenkung des pH-Werts im Endosom stellt eine Möglichkeit dar. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der H^+-ATPase durch Bafilomycin A eine Ansäuerung des Endosoms verhindert und die Translokation der Toxine ins Zytosol gehemmt wird [11]. Eine Aufnahme von TcdA oder TcdB in HT-29 Zellen konnte erst bei einem pH ≤5,6 beobachtet werden [62].
Eine Auswirkung von Ax auf den pH-Wert in Zellen wurde durch Fois et al. (2015) gezeigt [49]. Dabei wurde eine Anhebung des pH-Wertes in sauren Ca^{2+}-Speicher durch Ax induziert, was eine Freisetzung von Ca^{2+} bewirkte. Interessanterweise konnte bei Konzentrationen von 100 µM Ax eine Anhebung des pH-Werts auf >5,6 nach wenigen Sekunden in den sauren, Ca^{2+}-reichen *lamellar bodies* (LBs) beobachtet werden [49]. Würde eine Anhebung des pH-Werts auch in angesäuerten bzw. sauren Endosomen stattfinden, wäre dies ein Mechanismus, bei dem die Translokation der Toxine ins Zytosol inhibiert werden würde.

LBs stellen sekretorische Lysosome dar und gehören der Klasse der sauren Ca^{2+}-Speicher an [166, 49]. Ax scheint sich in sauren Kompartimenten der Zelle, z.B. sauren Ca^{2+}-Speicher oder

Endosomen, anzusammeln und dort eine Anhebung des pH-Wertes zu bewirken. Dabei wird die Anhebung des pH-Werts in den LBs durch eine Pufferwirkung von Ax auf die H^+-Ionen ausgelöst [49]. Andere Ursachen, wie die Inhibition der vesikulären H^+-ATPase, konnten von den Autoren ausgeschlossen werden [49]. Unterstützt werden diese Schlussfolgerungen durch die basischen und amphiphilen Eigenschaften von Ax, die eine Pufferwirkung in sauren Kompartimenten der Zelle sehr wahrscheinlich machen [112, 49]. Diese Pufferwirkung könnte ein Grund für den inhibitorischen Effekt von Ax auf die TcdA und TcdB sein, da eine Translokation ins Zytosol nur in saurem Milieu stattfindet [11]. Diese Pufferwirkung würde allerdings über die Zeit abgeschwächt werden, da eine Ansäuerung der Endosomen weiterhin stattfinden würde. Tatsächlich stieg die Anzahl an abgerundeten bzw. vergifteten Zellen über die Zeit an und nach 24 h konnten keine Unterschiede im Zellviabilitätsassay zwischen vergifteten Zellen und vergifteten Zellen, die zusätzlich mit Ax inkubiert wurden, gesehen werden.

Da eine inhibitorische Wirkung bei TcdA und TcdB nur bei Konzentration >50 µM Ax vorlag, scheinen geringere Konzentrationen keine ausreichende Pufferwirkung entfalten zu können. Tatsächlich würde rein rechnerisch, auf Grundlage der von Fois et al. (2015) publizierten Werte, noch eine Konzentration von >10 µM Ax ausreichen, um eine leichte inhibitorische Wirkung beobachten zu können. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass bei LBs ein pH-Wert von 5,6 bei einer Konzentration von 10 µM Ax gemessen wurde [49]. Für eine Toxinaufnahme war ein pH-Wert <5,6 nötig gewesen [62]. Dies sind allerdings theoretische Überlegungen und schließen nicht die Möglichkeit aus, dass weitere Mechanismen bei der inhibitorischen Wirkung von Ax eine Rolle spielen könnten. Zudem sollte bedacht werden, dass die pH-Messungen an LBs in Typ II Alveolarzellen durchgeführt wurden und somit nur bedingt auf Endosomen in Vero Zellen anwendbar sind.

Trotz der bedingten Anwendbarkeit kann eine Vermutung zur inhibitorischen Wirkungsweise von Ax auf TcdA und TcdB vergiftete Zellen gemacht werden. Um diesen Wirkungsmechanismus von Ax auf TcdA und TcdB zu bestätigen, sind allerdings weitere Experimente nötig. Insbesondere wäre ein Nachweis der Akkumulation von Ax in den via Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommenen Endosomen sinnvoll sowie der Nachweis einer pH-Wert Veränderung bzw. einer Pufferung des pH-Wertes durch Ax in den Endosomen. Dazu könnten bei Intoxikationen mit TcdA, TcdB und Ax u.a. pHrodo Farbstoffe zur Messung

des endosomalen pH-Wertes zum Einsatz kommen. Zusätzlich sollten weitere mögliche Wirkungsweisen in Betracht gezogen werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt für einen inhibitorischen Mechanismus besteht in der Inhibition der Glykosyltransferase der Toxine. So zeigte α-Definsin-5 eine Reduktion der Glykosyltransferaseaktivität von TcdB, da es mit UDP-Glucose um die Bindungsstelle an der Glykosyltransferasedomäne konkurriert [63]. Auch dies scheint eine Möglichkeit zu sein und könnte durch eine *in vitro* Glykosylierung von Rac1 durch TcdB und TcdA untersucht werden. Bei einer *in vitro* Glykosylierung von Rac1 wird Vero bzw. CaCo-2 Zelllysat mit dem Toxin und dem Inhibitor für eine bestimmte Zeit inkubiert und anschließend wird mittels SDS-Page und Western Blotting der Glykosylierungsstatus von Rac1 untersucht und mit der Toxinkontrolle verglichen. Bei einer geringeren Glykosylierung von Rac1 in Anwesenheit des Inhibitors spräche dies für eine Inhibition der Glycosyltransferase des Toxins durch den Inhibitor [89, 48].

Eine andere Möglichkeit für die inhibitorische Wirkungsweise ist eine Interaktion von Ax mit den Rezeptoren für TcdA und TcdB, die zu einer Hemmung führen könnte. Dabei ist zu beachten, dass ähnliche Konzentrationen von Ax eine ähnlich ausgeprägte inhibitorische Wirkung bei beiden Toxinen entfaltete. Dies lässt auf einen ähnlichen Mechanismus schließen, der für die Inhibition von TcdA und TcdB verantwortlich ist. Die Rezeptoren von TcdA und TcdB unterscheiden sich allerdings bzw. sind noch nicht bekannt [121, 157, 174, 3]. Des Weiteren scheinen mehrere Rezeptoren in die zelluläre Aufnahme der Toxine involviert zu sein [57, 95]. Eine spezifische Hemmung eines Rezeptors sollte deshalb zu Unterschieden bei der Inhibition der einzelnen Toxine führen. Zusätzlich wurde ein hemmender Effekt bei CDT beobachtet, bei dem der Rezeptor bekannt ist und sich von TcdA und TcdB unterscheidet [129]. Dies macht eine Hemmung der Oberflächenrezeptoren der Toxine noch unwahrscheinlicher. Wahrscheinlicher ist deshalb eine unspezifische inhibitorische Wirkungsweise, die eine Gemeinsamkeit von TcdA, TcdB und des binären AB-Toxins CDT betrifft.

Der hemmende Effekt von Ax auf CDT

CDT zählt zu den binären ADP-ribosylierenden Toxinen. Es wirkt zytotoxisch durch eine intrazelluläre ADP-Ribosylierung von G-Aktin mit schlussendlicher Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts [133, 12]. CDT ist ein binäres AB-Toxin, das zusätzlich in hypervirulenten

C. difficile Stämmen exprimiert wird und mit einem schwereren klinischen Verlauf und erhöhter Mortalität einhergeht [165, 55]. Da es zu einer Zunahme an hypervirulenten Stämmen weltweit kommt, werden vermehrt Inhibitoren für CDT bzw. für die klinisch relevante Kombination aus TcdA, TcdB und CDT gesucht.

Um eine Inhibition von CDT durch Ax zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Dabei wurden die gleichen Konzentrationen an Ax, die bei den Experimenten mit TcdA und TcdB angewendet wurden, auch bei CDT eingesetzt. Durch gleiche Konzentrationen sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Wirkung von Ax bei den Toxinen von *C. difficile* erreicht werden. In Zellexperimenten auf Vero Zellen konnte eine Inhibition von CDT durch Ax über 5 h gezeigt werden. Dabei zeigten Konzentrationen <100 µM Ax im Gegensatz zu Experimenten mit TcdA und TcdB keine relevante Inhibition mehr. Um dies weiter verifizieren zu können, wurde der ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin an Vero Zellen untersucht. Dabei konnte keine eindeutige Inhibition von CDT durch Ax gezeigt werden. In einem TEER-Experiment wurde der Effekt von CDT und Ax auf einen *monolayer*, bestehend aus CaCo-2 Zellen, untersucht. Dabei konnte eine inhibitorische Wirkung für 150 µM Ax auf CDT vergiftete Zellen gezeigt werden. Für 300 µM Ax konnte nur in den ersten 3 h ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden. Der starke Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstands wurde auf eine Beschädigung des Filters zurückgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen ist allerdings die Aussagekraft stark geschmälert und muss durch weitere Wiederholungen bestätigt werden. Insgesamt zeigen die Experimente, dass Ax im Vergleich zu den großen clostridialen Toxinen TcdA und TcdB eine weniger effektive Inhibition von CDT verursacht.

Da CDT ein binäres Toxin darstellt, konnte die inhibitorische Wirkung von Ax selektiv für die Bindungs- und Translokationskomponente (B-Komponente; CDTb) und für die enzymatisch aktive Komponente (A-Komponente; CDTa) untersucht werden.
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ax keinen Einfluss auf die Aktivität der ADP-Ribosyltransferase von CDTa *in vitro* hatte. Somit beruht die inhibitorische Wirkung von Ax nicht auf einer Inhibition der intrazelluläre Substratmodifikation durch CDTa, vielmehr scheint ein inhibitorischer Einfluss von Ax im Aufnahmeprozess von CDT wahrscheinlich.

Verschiedene Inhibitoren von Toxinen blockieren im Aufnahmeprozess die zur Translokation benötigte Ansäuerung der Endosomen [16, 11]. Für die Translokation von CDTa in das Zytosol wird eine Ansäuerung des Milieus im Endosomen benötigt, um eine Porenbildung durch CDTb

zu ermöglichen [10, 12]. Eine Ansäuerung des Endosomenmileus ist ebenfalls für den Aufnahmemechanismus von TcdA und TcdB bekannt [11]. Da bei TcdA und TcdB eine H^+-Pufferung als möglicher Wirkungsmechanismus für die Inibition durch Ax in Betracht kommt (siehe oben), scheint ein ähnlicher Wirkungsmechanismus für CDT plausibel.
Das C2-Toxin, ein CDT-ähnliches binäres Toxin, benötigt für die Translokation ins Zytosol pH-Werte <5,5 [22, 10, 155]. Bei Annahme ähnlicher Werte für CDT würde die These einer Inhibition durch Ax über eine Pufferwirkung in den Endosomen gestärkt werden. Allerdings war eine Inhibition bei CDT-vergifteten Zellen nur durch höhere Konzentrationen an Ax im Vergleich zu TcdA/TcdB vergifteten Zellen zu erreichen. Dies steht im Gegensatz zu der Tatsache, dass CDT bzw. das C2-Toxin niedrigere pH-Werte für eine Translokation ins Zytosol benötigen als TcdA oder TcdB und damit bei einer Pufferwirkung in den Endosomen durch Ax stärker inhibiert werden müssten [62]. Da allerdings von pH-Werten ausgegangen wird, die für das C2-Toxin bestimmt wurden, könnte eine genauere Analyse der benötigten pH-Werte für eine Translokation von CDT ins Zytosol weiterhelfen. Alternativ wären Experimente mit Ax und weiteren binären ADP-ribosylierenden Toxinen sinnvoll, bei denen schon Daten über pH-Werte, die bei der Aufnahme in die Zelle nötig sind, publiziert wurden. Dazu gehören zum Beispiel das C2-Toxin und das Iota-Toxin, bei dem ein noch saureres Milieu (pH <5,0) zur Translokation vorliegen muss [61, 21, 88, 155].

Eine weitere Möglichkeit ist ein inhibitorischer Einfluss von Ax bei der Interaktion von CDTb mit dem Rezeptor. Dies wurde untersucht, durch Vergleich der Bindung von CDTb an den Rezeptor in An- und Abwesenheit von Ax. Jedoch konnte kein Einfluss von Ax auf die Bindung von CDTb an den Rezeptor festgestellt werden. Dies steht auch im Einklang mit der Überlegung, dass es sich um einen unspezifischen, inhibitorischen Wirkungsmechanismus durch Ax handelt, weil eine Hemmung bei unterschiedlichen Toxinen (CDT, TcdA und TcdB) gezeigt werden konnte und diese sich z. T. bei der Rezeptorbindung und intrazellulären Substratmodifikation unterscheiden.

Ein weiteres Indiz für einen unspezifischen Wirkungsmechanismus ist die fast vollständige Inhibition des zytotoxischen Eigeneffekts von CDTb durch Ax. Die Bindungs- und Translokationskomponente CDTb zeigte in früheren Arbeiten aus der AG Barth zytotoxische Eigeneffekte [141, 123]. Dass die Bindungs- und Translokationskomponenten von binären AB-Toxinen in hohen Konzentrationen zytotoxische Eigeneffekte aufweisen, ist für die

Bindungskomponente des Iota-Toxin (Ib) schon länger bekannt [120]. Dieser Effekt zeigte sich durch eine rasche Erschöpfung an zelleigenem Adenosintriphosphat (ATP) und anschließender Zellnekrose bei A431 Zellen [88, 120]. Es wird davon ausgegangen, dass der zytotoxische Effekt der Bindungs- und Translokationskomponenten auf einer Porenbildung in der Membran beruht und zum Verlust der Membranintegrität führt [119, 120, 88]. Erwähnenswert hierbei ist, dass deutlich höhere Konzentrationen der Bindungs- und Translokationskomponente für den zytotoxischen Eigeneffekt nötig sind als bei einer Vergiftung mit der enzymatisch aktiven Komponente und der Bindungs- und Translokationskomponente zusammen. Bei Ausbildung eines zytotoxischen Eigeneffekts führten sehr hohe Konzentrationen von CDTb zu morphologischen Veränderungen mit anschließendem Zelluntergang, während die morphologischen Veränderungen bei geringeren Konzentrationen reversibel waren und nicht zum Zelluntergang führten [141, 123]. Dies wurde auf zelleigene Reparatur- und Abwehrmechanismen zurückgeführt wie z. B. die endozytotische Aufnahme der porenbildenden Elementen zum Erhalt der Membranintegrität [111, 77, 78, 120].

Durch zusätzliche Inkubation mit geringen Konzentrationen an Ax konnte der zytotoxische Eigeneffekt von CDTb fast vollständig inhibiert werden, was vor allem durch Messungen der Zellviabilität gezeigt wurde. Dabei zeigten schon geringe Konzentrationen an Ax von 3 µM einen inhibitorischen Effekt über einen Zeitraum von 26 h. Dies lässt auf eine Interaktion zwischen Ax und CDTb schließen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass zwar der zytotoxische CDTb Effekt fast vollständig gehemmt wurde, eine Inhibition von CDT jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen an Ax gelang. Somit scheint ein wesentlicher Unterschied bei der Inhibition von CDT und des zytotoxischen CDTb Effekts die Anwesenheit von CDTa zu sein. Eine Inhibiton von CDTa wurde bereits ausgeschlossen und somit bleibt als interessantester Ansatzpunkt für einen inhibitorischen Mechanismus die Porenbildung von CDTb. Für eine effektive Inhibition des zytotoxischen CDTb Effekts reicht eine Blockade der Pore aus. Dies wurde schon durch andere Inhibitoren wie Chloroquin und positiv geladenen heterozyklischen Molekülen wie Fluphenazin nachgewiesen [7, 8, 122, 145]. Bei der Inhibition der Translokations- und Bindungkomponente des C2-Toxins (C2II) binden Chloroquin und ähnliche Moleküle am Vorhof der Pore an der *cis*-Seite, an der auch die enzymatische Einheit binden würde [7, 8, 145]. Dies wird durch Bindung der Substanzen an die negativ geladenen Aminosäuren Glu399 und Asp426 vermittelt [122]. Dadurch wird die Pore effektiv geschlossen, was einerseits die Translokation der enzymatisch aktiven A-Komponente hemmt

und andererseits auch zytotoxische Eigeneffekte der Bindungs- und Translokationskomponente blockieren kann [123, 145, 6, 7]. Ax teilt sich gewisse Ähnlichkeiten mit Chloroquin und weiteren Inhibitoren. So weist es eine heterozyklische Form und eine Aminogruppe auf und ist eine schwache Base [112]. Eine Porenblockade durch Ax scheint deshalb ein möglicher inhibitorischer Mechanismus zu sein. Dieser Effekt scheint bei Anwesenheit von CDTa allerdings nicht oder nur ungenügend zu funktionieren, da für CDT höhere Konzentrationen an Ax für einen inhibitorischen Effekt gebraucht werden. Möglicherweise bedeutet dies, dass CDTa die Interaktion von Ax als Porenblocker mit der Pore von CDTb behindert. Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen des Iota-Toxins, bei dem keine Inhibition der Zytotoxizität durch Chloroquin gezeigt werden konnte, im Gegensatz zu dem C2-Toxin [131, 7]. Trotzdem konnte eine Blockade der Ib-induzierten Kanäle durch Chloroquin gezeigt werden, wenn auch mit einer geringen Affinität. Die enzymatisch aktive Komponente des Iota-Toxins (Ia) blockiert wiederum die Pore effektiv und zeigte dabei eine sehr hohe Affinität [87]. Eine schwache Inhibition der zytotoxischen Pore von CDTb durch Ambroxol, die bei Anwesenheit von CDTa nicht mehr ausreichend für eine starke Inhibition der Zytotoxizität ist, könnte die Folge sein. Eine Untersuchung Leitfähigkeit der Pore in An- und Abwesenheit von CDTa und Ax könnte die Affinitäten der Substanzen klären. Eine weitere Möglichkeit wäre mit Hilfe von *Ca^{2+}-Imaging* den Einfluss von Ax auf die Pore zu untersuchen. Durch Porenbildung kommt es zu einem Ca^{2+}-Einstrom, was durch Überwachung des Ca^{2+}-Status der Zelle beobachtet werden kann.

Trotz hoher Gemeinsamkeiten der binären AB-Toxine, die z.B. einen Austausch der verschiedenen Komponenten erlaubt, gibt es trotzdem Unterschiede, die die Inhibition durch verschiedene Substanzen beeinflussen kann [131, 122, 87, 88, 155]. So scheinen weitere Experimente mit binären AB-Toxinen wie C2 und dem Iota-Toxin angebracht, um die Auswirkung von Ax auf die Toxine zu untersuchen und dadurch neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Ax zu erlangen.

Zelluläre Aufnahme und Eigeneffekt von Ax

Die sekundenschnelle Aufnahme von Ax erfolgt durch passive, unspezifische Diffusion [49]. In den Zellexperimenten mit Vero Zellen konnte kein Unterschied bei einer 30-minütigen Preinkubation von Ax und einer gleichzeitigen Gabe mit den Toxinen beobachtet werden, da die schnelle Aufnahme eine Preinkubation überflüssig machte. Dass die Aufnahme von Ax

über eine passive, unspezifische Diffusion erfolgt, wird durch den sehr schnell einsetzenden Eigeneffekt von Ax bei Vero Zellen untermauert. So zeigten sich durch höhere Ax-Konzentrationen morphologische Änderungen, die ähnlich wie die Vergiftungsmorphologie mit Ausziehungen und Abrundungen der Zellen einhergingen, innerhalb der ersten Stunden. Bei hohen Konzentrationen an Ax mit 300 µM zeigten sich diese noch im Verlauf zum größten Teil reversibel, während sehr hohe Konzentrationen über 300 µM irreversibel waren und den Untergang der Vero und CaCo-2 Zellen zur Folge hatten. Da die Bindung an Rezeptoren oder eine zeitaufwändigere Endozytose entfallen, war eine Preinkubation, wie sie beispielsweise bei den Chaperoninhibitoren Radicicol, FK506 u.a. in der AG Barth angewandt wurden, nicht nötig [83, 42].

Ein weiterer interessanter Aspekt wurde bei der Untersuchung des Eigeneffekts von Ax auf CaCa-2 Zellen festgestellt. So wurde eine leichte Reduktion der Zellviabilität bei Ax nach >24 h bei CaCo-2 Zellen festgestellt. Aufgrund der hohen Sensitivität des CaCo-2 Monolayers, ist es möglich, mit TEER-Experimenten kleinste Veränderungen in der Integrität des CaCo-2 Monolayers zu messen. So wurde im TEER-Assay ein Anstieg des elektrischen Widerstands, der mit Ax behandelten Zellen beobachtet. Dabei war der Anstieg unabhängig von der Konzentration (150 µM oder 300 µM) und über den gesamten Zeitraum von 6 h sichtbar. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung im MTS-Assay über 24 h, die eine Reduktion der Zellviabilität bei Zugabe von Ax zeigte. Hier ist wichtig die Grenzen bei der Untersuchung der Zellviabilität zu beachten. Die Zellviabilität hängt maßgeblich von der Anzahl an vitalen Zellen ab und es kann deshalb aufgrund von leichten Abweichungen beim Pipettieren oder Verzögerungen bei der Zugabe von MTS-Substrat zu einer scheinbar höheren Zellviabilität kommen, ohne dass diese tatsächlich vorhanden wäre. Dadurch ließe sich der leichte Abfall der Zellviabilität nach >24 h bei Zellen mit kleineren Konzentrationen als 150 µM erklären, da diese einen Abfall der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Bei weiteren Versuchen mit CaCo-2 Zellen wurde ein Abfall der Zellviabilität bei weniger als 150 µM nicht mehr beobachtet.

Ausblick in die klinische Anwendbarkeit von Ax in CDAD

Der Wirkungsort von Ax sollte sich bei Anwendung im Rahmen einer CDI im Colon befinden und dort eine ausreichende Wirkstoffkonzentration erreichen können, ohne gravierende Nebenwirkungen zu verursachen.

Für eine ausreichende Wirkstoffkonzentration ist u.a. die Toxizität von Ax entscheidend. Um eine Wirkung auf die Toxine TcdA, TcdB und CDT zu erreichen, waren in dieser Arbeit Konzentrationen von ≥50 µM Ax nötig. Bei therapeutischen Dosen von 90-120 mg/Tag Ax beträgt die Plasmakonzentration von Ax etwa 0,6-1,2 µM [114, 49]. Dies lässt aufgrund des Lungentropismus von Ax eine Konzentration von etwa 18 µM im Lungengewebe annehmen [49]. Höhere Konzentrationen von Ax (1000 mg pro Tag) wurden schon in klinischen Studien angewendet [171, 152]. Eine Toxizität ist dabei auch bei noch höheren Dosen noch nicht zu erwarten [106].

Um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration zu erreichen, wäre eine krankheits- bzw. ortsspezifische Freisetzung im Colon wünschenswert, da die Plasmakonzentration von Ax nicht ausreichend für eine Hemmung der Toxine bei normaler oraler Aufnahme ist. Die gezielte Freisetzung von Ax im Colon kann über pH-abhängige Systeme, Enzym-getriggerte Systeme, Rezeptor-vermittelte Systeme oder magnetisch basierte Systeme stattfinden [99]. Hierbei muss auf die pathologischen Veränderungen, die sich bei einer CDI ergeben, geachtet werden, um eine wirkungsvolle Methode zur Freisetzung von Ax im Colon zu etablieren. CDI-induzierte Veränderungen betreffen z. B. die Darmflora, Mucuszusammensetzung oder den pH-Wert im Darm [37, 143, 153, 38]. Beim pH-Wert zeigte eine Kohortenstudie einen Zusammenhang zwischen einem alkalischeren fäkalen pH-Wertes und einer CDI Infektion. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass ein hoher alkalischer pH-Wert im Colon einen Einfluss auf eine CDI haben könnte [69]. Tatsächlich scheint *C. difficile* durch Hemmung des *Na^+/H^+ exchanger 3* (NHE3) ein alkalischeres Milieu zu schaffen [38, 34]. Ein pH-abhängiges System zur Medikamentenfreisetzung im Colon für Ax könnte sich diesen Zusammenhang zunutze machen, da der Mechanismus auf dem erhöhten pH-Wert im Colon, verglichen mit dem oberen Verdauungstrakt, beruht und durch ein alkalischeres Dickdarmmilieu eine höhere Zielgenauigkeit erreicht werden könnte.

Ebenfalls interessant bei klinischer Anwendung im Rahmen einer CDAD wären die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Ax. Eine Reduktion der Immunantwort auf eine bakterielle Entzündung scheint zunächst kontraproduktiv. Jedoch konnten schon antivirale Eigenschaften von Ax nachgewiesen werden. Dabei erhöhte Ax die Überlebensrate von Mäusen nach Influenzainfektion trotz negativer Effekte auf das Immunsystem, was auf der Stimulation von Suppressoren der Influenza-Virusvermehrung beruhte [172].

Aufgrund der starken Lungenanreicherung von Ax und der in dieser Arbeit beobachteten inhibitorischen Effekte auf AB-Toxine wären weitere Experimente an AB-Toxinen, die im Atmungstrakt bzw. im Lungengewebe sezerniert werden, interessant. Dabei könnten wichtige Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Ax auf bakterielle Toxine gesammelt werden. Schlussendlich müssen weitere Experimente den inhibitorischen Mechanismus von Ax auf die clostridialen Toxine TcdA, TcdB, CDT und auf den zytotoxischen Eigeneffekt von CDTb klären.

5 Zusammenfassung

Eine Zunahme an Fällen von *Clostridioides (C.) difficile* Erkrankungen ist weltweit zu sehen. Vor allem hypervirulente Stämme sowie vermehrte Antibiotikaresistenzen durch häufigeren Einsatz an Antibiotika führen zu einer Zunahme. Die Suche nach neuen Therapeutika gegen die Toxine als Hauptvirulenzfaktoren ist deshalb unerlässlich. Bereits anderweitig zugelassene Medikamente und körpereigene Stoffe werden dabei präferiert, da sie Vorteile in der Anwendung und Sicherheit mit sich bringen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das bereits zugelassene Medikament Ambroxol (Ax) einen inhibitorischen Effekt auf die Toxine Toxin A (TcdA), Toxin B (TcdB) und *Clostridium difficile* Transferase (CDT) von *C. difficile* hat. In Zytotoxizitätsversuchen wurde die Wirkung von Ax auf die Toxine TcdA, TcdB und CDT untersucht. Dabei wurde der Verlauf der Vergiftung beobachtet und eine Zeitabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch Ax festgestellt. Aufbauend auf den Zellversuchen wurde bei TcdA und TcdB auf molekularer Ebene der Glykosylierungsstatus von Rac1 untersucht. Bei Rac1 handelt es sich um ein Substrat der Glykosyltransferase von TcdA und TcdB und dies wurde genutzt, um auf molekularer Ebene eine Vergiftung durch die Toxine anzuzeigen. Für TcdA wurde ein inhibitorischer Effekt von Ax bei der Analyse des Glykosylierungsstatus von Rac1 in CaCo-2 Zellen nachgewiesen. Ebenso konnte für TcdB ein inhibitorischer Effekt von Ax auf den Glykosylierungsstatus von Rac1 in Vero Zellen gezeigt werden. Eine Hemmung durch Ax wurde ebenfalls für die klinisch relevante Kombination aus TcdA und TcdB in Zytotoxizitätsversuchen gezeigt.

Eine Hemmung in Zytotoxizitätsversuchen mit CDT konnte erst bei höheren Konzentrationen von im Vergleich zu TcdA und TcdB gezeigt werden. Eine eindeutige Inhibition durch Ax wurde weder im TEER Assay noch bei Auswertung des ADP-Ribosylierungsstatus von G-Aktin innerhalb der Zellen beobachtetet. Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise wurden die einzelnen Komponenten von CDT untersucht. Ein Einfluss von Ax auf die Enzymaktivität der enzymatisch aktiven A-Komponente von CDT (CDTa) wurde nicht festgestellt. Ebenso konnte kein Einfluss von Ax auf die Rezeptorbindung der Bindungs- und Translokationskomponente von CDT (CDTb) gezeigt werden. Jedoch ließ sich ein inhibitorischer Effekt von Ax auf den zytotoxischen Eigeneffekt von CDTb beobachtet. Dieser inhibitorische Effekt trat schon bei

deutlich geringeren Konzentrationen als bei TcdA, TcdB oder CDT auf und zeigte sich über einen längeren Zeitraum von >24 h konstant.

Außerdem wurde ein Eigeneffekt von Ax auf die verwendeten Zelllinien der Vero und CaCo-2 Zellen beobachtet. Die morphologischen Veränderungen traten innerhalb der ersten beiden Stunden auf und waren bei niedrigeren Konzentrationen von Ax reversibel. Bei höheren Konzentrationen wurden irreversible Auswirkungen auf die Zellviabilität festgestellt.

Eine Theorie über die inhibitorische Wirkungsweise von Ax auf TcdA, TcdB und CDT basiert auf einer möglichen Inhibition durch eine pH-Pufferung in den Endosomen, durch die die Ansäuerung des endosomalen Milieus inhibiert wird. Die endosomale Ansäuerung ist ein notwendiger Schritt für die Translokation der enzymatisch aktiven Domänen ins Zytosol. Tatsächlich konnte Ax schon eine Anhebung des pH-Wertes in sauren Ca^{2+}-Speichern in der Lunge auslösen, was auf dem basischen Charakter und einer sekundenschnellen, passiven Diffusion von Ax zurückzuführen war. Eine pH-Pufferung scheint deshalb die wahrscheinlichste Wirkungsweise. Weitere inhibitorische Mechanismen können nicht ausgeschlossen werden, v.a. da sich die Konzentrationsunterschiede bei der Inhibition von TcdA/TcdB und CDT durch eine alleinige pH-Pufferung von Ax nicht erklären ließen.

Desweitern scheint eine Interaktion mit der Pore von CDTb denkbar. Ax weist Ähnlichkeiten zu bekannten Porenblockern wie Chloroquin auf und zeigte eine starke Inhibition des zytotoxische Eigeneffekt von CDTb. Es wird vermutet, dass dieser ähnlich wie bei Porenbildenden Toxinen (PFTs) auf einer Porenbildung in der Membran zurückzuführen ist und die Membranintegrität stört. Eine Blockade der CDTb-induzierten Pore ist denkbar.

Da die Wirkungsweise von Ax nicht geklärt werden konnte, scheinen weiterer Experimente zur Klärung der Wirkungsweise indiziert. Ob Ax eine inhibitorische Wirkung auf andere bakterielle Toxine hat, könnte zur Ermittlung der Wirkungsweise beitragen und damit das Verständnis für inhibitorische Mechanismen an bakteriellen Toxinen erweitern und bei der Suche nach geeigneten Therapien für *C. difficile* Erkrankungen hilfreich sein. Weitere Experimente zur Wirkungsweise scheinen deshalb sinnvoll zu sein.

6 Literaturverzeichnis

[1] Aktories K, Bärmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs K H, Habermann E: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. Nature, 322: 390–392 (1986)

[2] Aktories K, Wegner A: ADP-ribosylation of actin by clostridial toxins. J Cell Biol, 109: 1385–1387 (1989)

[3] Aktories K, Schwan C, Jank T: Clostridium difficile Toxin Biology. Annu Rev Microbiol, 71: 281–307 (2017)

[4] Albin R L, Dauer W T: Magic shotgun for Parkinson's disease? Brain, 137: 1274–1275 (2014)

[5] Al-Jashaami L S, DuPont H L: Management of Clostridium difficile Infection. Gastroenterol Hepatol (N Y), 12: 609–616 (2016)

[6] Artenstein A W, Opal S M, Cristofaro P, Palardy J E, Parejo N A, Green M D, Jhung J W: Chloroquine enhances survival in Bacillus anthracis intoxication. J Infect Dis, 190: 1655–1660 (2004)

[7] Bachmeyer C, Benz R, Barth H, Aktories K, Gilbert M, Popoff M R: Interaction of Clostridium botulinum C2 toxin with lipid bilayer membranes and Vero cells: inhibition of channel function by chloroquine and related compounds in vitro and intoxification in vivo. FASEB J, 15: 1658–1660 (2001)

[8] Bachmeyer C, Orlik F, Barth H, Aktories K, Benz R: Mechanism of C2-toxin inhibition by fluphenazine and related compounds: investigation of their binding kinetics to the C2II-channel using the current noise analysis. J Mol Biol, 333: 527–540 (2003)

[9] Barroso L A, Moncrief J S, Lyerly D M, Wilkins T D: Mutagenesis of the Clostridium difficile toxin B gene and effect on cytotoxic activity. Microb Pathog, 16: 297–303 (1994)

[10] Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K: Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. J Biol Chem, 275: 18704–18711 (2000)

[11] Barth H, Pfeifer G, Hofmann F, Maier E, Benz R, Aktories K: Low pH-induced formation of ion channels by clostridium difficile toxin B in target cells. J Biol Chem, 276: 10670–10676 (2001)

[12] Barth H, Aktories K, Popoff M R, Stiles B G: Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiol Mol Biol Rev, 68: 373-402 (2004)

[13] Bauer M P, Notermans D W, van Benthem B H B, Brazier J S, Wilcox M H, Rupnik M, Monnet D L, van Dissel J T, Kuijper E J: Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet, 377: 63–73 (2011)

[14] Beeh K M, Beier J, Esperester A, Paul L D: Antiinflammatory properties of ambroxol. Eur J Med Res, 13: 557–562 (2008)

[15] Bendikov-Bar I, Maor G, Filocamo M, Horowitz M: Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. Blood Cells Mol Dis, 50: 141–145 (2013)

[16]Benz R, Barth H: Toxin Transport by A-B Type of Toxins in Eukaryotic Target Cells and Its Inhibition by Positively Charged Heterocyclic Molecules, 406: 229–256 (2017)
[17]Betz R: Glukokortikosteroide und Ambroxol hemmen die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine in tracheobronchialen Epithelzellen: Mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors NF-kappa B. Pneumologie, 51: 491–492 (1997)
[18]Beutler B: Endotoxin, tumor necrosis factor, and related mediators: new approaches to shock. New Horiz, 1: 3–12 (1993)
[19]Bianchi M, Mantovani A, Erroi A, Dinarello C A, Ghezzi P: Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells. Agents Actions, 31: 275–279 (1990)
[20]Bischofberger M, Iacovache I, van der Goot F G: Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. Cell Host Microbe, 12: 266–275 (2012)
[21]Blöcker D, Behlke J, Aktories K, Barth H: Cellular uptake of the Clostridium perfringens binary iota-toxin. Infect Immun, 69: 2980–2987 (2001)
[22]Blöcker D, Bachmeyer C, Benz R, Aktories K, Barth H: Channel formation by the binding component of Clostridium botulinum C2 toxin: glutamate 307 of C2II affects channel properties in vitro and pH-dependent C2I translocation in vivo. Biochemistry, 42: 5368–5377 (2003)
[23]Bohach G A, Fast D J, Nelson R D, Schlievert P M: Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. Crit Rev Microbiol, 17: 251–272 (1990)
[24]Burckhardt F, Friedrich A, Beier D, Eckmanns T: Clostridium difficile Surveillance Trends, Saxony, Germany. Emerg Infect Dis, 14: 691–692 (2008)
[25]Burridge K, Wennerberg K: Rho and Rac Take Center Stage. Cell, 116: 167–179 (2004)
[26]Carter G P, Chakravorty A, Pham Nguyen T A, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol S P, Cheknis A, Figueroa I, Johnson S, Gerding D, Rood J I, Dougan G, Lawley T D, Lyras D: Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during Clostridium difficile Infections. mBio, 6: e00551-15 (2015)
[27]Cataldi M, Sblendorio V, Leo A, Piazza O: Biofilm-dependent airway infections: a role for ambroxol? Pulm Pharmacol Ther, 28: 98–108 (2014)
[28]Chandrasekaran R, Kenworthy A K, Lacy D B: Clostridium difficile Toxin A Undergoes Clathrin-Independent, PACSIN2-Dependent Endocytosis. PLoS Pathog, 12: e1006070 (2016)
[29]Chaves-Olarte E, Weidmann M, Eichel-Streiber C, Thelestam M: Toxins A and B from Clostridium difficile differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. J Clin Invest, 100: 1734–1741 (1997)
[30]Choi S W, Gu Y, Peters R S, Salgame P, Ellner J J, Timmins G S, Deretic V: Ambroxol Induces Autophagy and Potentiates Rifampin Antimycobacterial Activity. Antimicrob Agents Chemother, 62 (2018)

[31]Clark G F, Krivan H C, Wilkins T D, Smith D F: Toxin A from Clostridium difficile binds to rabbit erythrocyte glycolipids with terminal Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc sequences. Arch Biochem Biophys, 257: 217–229 (1987)
[32]Collier R J: Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriol Rev, 39: 54–85 (1975)
[33]Dal Peraro M, van der Goot F G: Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. Nat Rev Microbiol, 14: 77–92 (2016)
[34]Dudek-Wicher R K, Junka A, Bartoszewicz M: The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. Prz Gastroenterol, 13: 85–92 (2018)
[35]Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell K J F, Aktories K: Auto-catalytic cleavage of Clostridium difficile toxins A and B depends on cysteine protease activity. J Biol Chem, 282: 25314–25321 (2007)
[36]Eichel-Streiber C von, Laufenberg-Feldmann R, Sartingen S, Schulze J, Sauerborn M: Comparative sequence analysis of the Clostridium difficile toxins A and B. Mol Gen Genet, 233: 260–268 (1992)
[37]Engevik M A, Yacyshyn M B, Engevik K A, Wang J, Darien B, Hassett D J, Yacyshyn B R, Worrell R T: Human Clostridium difficile infection: altered mucus production and composition. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 308: G510-24 (2015)
[38]Engevik M A, Engevik K A, Yacyshyn M B, Wang J, Hassett D J, Darien B, Yacyshyn B R, Worrell R T: Human Clostridium difficile infection: inhibition of NHE3 and microbiota profile. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 308: G497-509 (2015)
[39]Ernst K, Langer S, Kaiser E, Osseforth C, Michaelis J, Popoff M R, Schwan C, Aktories K, Kahlert V, Malesevic M, Schiene-Fischer C, Barth H: Cyclophilin-facilitated membrane translocation as pharmacological target to prevent intoxication of mammalian cells by binary clostridial actin ADP-ribosylated toxins. J Mol Biol, 427: 1224–1238 (2015)
[40]Ernst K, Schnell L, Barth H: Host Cell Chaperones Hsp70/Hsp90 and Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerases Are Required for the Membrane Translocation of Bacterial ADP-Ribosylating Toxins. Curr Top Microbiol Immunol, 406: 163–198 (2017)
[41]Ernst K, Schmid J, Beck M, Hägele M, Hohwieler M, Hauff P, Ückert A K, Anastasia A, Fauler M, Jank T, Aktories K, Popoff M R, Schiene-Fischer C, Kleger A, Müller M, Frick M, Barth H: Hsp70 facilitates trans-membrane transport of bacterial ADP-ribosylating toxins into the cytosol of mammalian cells. Sci Rep, 7 (2017)
[42]Ernst K, Kling C, Landenberger M, Barth H: Combined Pharmacological Inhibition of Cyclophilins, FK506-Binding Proteins, Hsp90, and Hsp70 Protects Cells From Clostridium botulinum C2 Toxin. Front Pharmacol, 9 (2018)
[43]Farkhutdinov U R, Farkhutdinov R R, Petriakov V V, Farkhutdinov S U, Mirkhaĭdarov A M: Effect of mucolytic therapy on the production of reactive oxygen species in the blood of patients with an exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Ter Arkh, 82: 29–32 (2010)
[44]Fatima R, Aziz M: The Hypervirulent Strain of Clostridium Difficile: NAP1/B1/027 - A Brief Overview. Cureus (2019)

[45]Fiorentini C, Thelestam M: Clostridium difficile toxin A and its effects on cells. Toxicon, 29: 543–567 (1991)
[46]Fischer J, Pschorn U, Vix J-M, Peil H, Aicher B, Müller A, Mey C de: Efficacy and tolerability of ambroxol hydrochloride lozenges in sore throat. Randomised, double-blind, placebo-controlled trials regarding the local anaesthetic properties. Arzneimittelforschung, 52: 256–263 (2002)
[47]Fischer S, Popoff M R, Barth H: Human alpha-defensin-1 protects cells from intoxication with Clostridium perfringens iota toxin. Pathog Dis, 76 (2018)
[48]Fischer S, Ückert A-K, Landenberger M, Papatheodorou P, Hoffmann-Richter C, Mittler A-K, Ziener U, Hägele M, Schwan C, Müller M, Kleger A, Benz R, Popoff M R, Aktories K, Barth H: Human peptide α-defensin-1 interferes with Clostridioides difficile toxins TcdA, TcdB, and CDT. FASEB J, 34: 6244–6261 (2020)
[49]Fois G, Hobi N, Felder E, Ziegler A, Miklavc P, Walther P, Radermacher P, Haller T, Dietl P: A new role for an old drug: Ambroxol triggers lysosomal exocytosis via pH-dependent Ca^{2+} release from acidic Ca^{2+} stores. Cell Calcium, 58: 628–637 (2015)
[50]Freeman J, Bauer M P, Baines S D, Corver J, Fawley W N, Goorhuis B, Kuijper E J, Wilcox M H: The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. Clin Microbiol Rev, 23: 529–549 (2010)
[51]Frey S M, Wilkins T D: Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on Clostridium difficile toxin A. Infect Immun, 60: 2488–2492 (1992)
[52]Fu X, Yu J, Liu G, Deng B: Comparison of the effect of ambroxol and dexamethasone on the expression of pulmonary surfactant proteins in the fetal rat lungs. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 42: 450–453 (2004)
[53]Geffers C, Gastmeier P: Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger. Dtsch Arztebl International, 7: [26] (2011)
[54]Genth H, Aktories K, Just I: Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. J Biol Chem, 274: 29050–29056 (1999)
[55]Gerding D N, Johnson S, Rupnik M, Aktories K: Clostridium difficile binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. Gut Microbes, 5: 15–27 (2014)
[56]Gerhard R, Nottrott S, Schoentaube J, Tatge H, Olling A, Just I: Glucosylation of Rho GTPases by Clostridium difficile toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. J Med Microbiol, 57: 765–770 (2008)
[57]Gerhard R, Frenzel E, Goy S, Olling A: Cellular uptake of Clostridium difficile TcdA and truncated TcdA lacking the receptor binding domain. J Med Microbiol, 62: 1414–1422 (2013)
[58]Germouty J, Jirou-Najou J L: Clinical efficacy of ambroxol in the treatment of bronchial stasis. Clinical trial in 120 patients at two different doses. Respiration, 51 Suppl 1: 37–41 (1987)
[59]Gibbs B F, Schmutzler W, Vollrath I B, Brosthardt P, Braam U, Wolff H H, Zwadlo-Klarwasser G: Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. Inflamm Res, 48: 86–93 (1999)

[60]Gibert M, Petit L, Raffestin S, Okabe A, Popoff M R: Clostridium perfringens iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. Infect Immun, 68: 3848–3853 (2000)
[61]Gibert M, Marvaud J C, Pereira Y, Hale M L, Stiles B G, Boquet P, Lamaze C, Popoff M R: Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: iota toxin requires a membrane potential gradient. FEBS Lett, 581: 1287–1296 (2007)
[62]Giesemann T, Jank T, Gerhard R, Maier E, Just I, Benz R, Aktories K: Cholesterol-dependent pore formation of Clostridium difficile toxin A. J Biol Chem, 281: 10808–10815 (2006)
[63]Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K: Human alpha-defensins inhibit Clostridium difficile toxin B. Gastroenterology, 134: 2049–2058 (2008)
[64]Gillissen A, Bartling A, Schoen S, Schultze-Werninghaus G: Antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells in vitro. Lung, 175: 235–242 (1997)
[65]Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast S B, Harmanus C, Notermans D W, Bergwerff A A, Dekker F W, Kuijper E J: Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis, 47: 1162–1170 (2008)
[66]Gruenberg J, van der Goot F G: Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. Nat Rev Mol Cell Biol, 7: 495–504 (2006)
[67]Grünewald T, Kist M, Mutters R, Ruf B R, Kern W V: Clostridium-difficile-Infektion. Dtsch Med Wochenschr, 135: 699–703 (2010)
[68]Gülke I, Pfeifer G, Liese J, Fritz M, Hofmann F, Aktories K, Barth H: Characterization of the Enzymatic Component of the ADP-Ribosyltransferase Toxin CDTa from Clostridium difficile. Infect Immun, 69: 6004–6011 (2001)
[69]Gupta P, Yakubov S, Tin K, Zea D, Garankina O, Ghitan M, Chapnick E K, Homel P, Lin Y S, Koegel M M: Does Alkaline Colonic pH Predispose to Clostridium difficile Infection? South Med J, 109: 91–96 (2016)
[70]Hammer R, Bozler G, Jauch R, Koss F W, Hadamovsky H: Speziesvergleich in Pharmakokinetik und Metabolismus von NA 872 Cl Ambroxol bei Ratte, Kaninchen, Hund und Mensch. Arzneimittelforschung, 28: 899–903 (1978)
[71]Haug G, Wilde C, Leemhuis J, Meyer D K, Aktories K, Barth H: Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin: membrane translocation of a fusion toxin requires unfolding of its dihydrofolate reductase domain. Biochemistry, 42: 15284–15291 (2003)
[72]Haug G, Leemhuis J, Tiemann D, Meyer D K, Aktories K, Barth H: The host cell chaperone Hsp90 is essential for translocation of the binary Clostridium botulinum C2 toxin into the cytosol. J Biol Chem, 278: 32266–32274 (2003)
[73]Heber S, Barthold L, Baier J, Papatheodorou P, Fois G, Frick M, Barth H, Fischer S: Inhibition of Clostridioides difficile Toxins TcdA and TcdB by Ambroxol. Front Pharmacol, 12: 809595 (2021)

[74]Hemmasi S, Czulkies B A, Schorch B, Veit A, Aktories K, Papatheodorou P: Interaction of the Clostridium difficile Binary Toxin CDT and Its Host Cell Receptor, Lipolysis-stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). J Biol Chem, 290: 14031–14044 (2015)
[75]Herman A, Kappler J W, Marrack P, Pullen A M: Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. Annu Rev Immunol, 9: 745–772 (1991)
[76]Heytmanek G, Salzer H, Vityska-Binstorfer E, Genger H, Metka M, Pfersmann R, Wolff F, Weidinger H: Ambroxol versus Betamethason zur Förderung der antepartalen Lungenreife bei pathologischen Schwangerschaften. Wien Klin Wochenschr, 102: 443–448 (1990)
[77]Husmann M, Beckmann E, Boller K, Kloft N, Tenzer S, Bobkiewicz W, Neukirch C, Bayley H, Bhakdi S: Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. FEBS Lett, 583: 337–344 (2009)
[78]Idone V, Tam C, Goss J W, Toomre D, Pypaert M, Andrews N W: Repair of injured plasma membrane by rapid Ca2+-dependent endocytosis. J Cell Biol: 905–914 (2008)
[79]Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S: Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol, 171: 939–945 (2005)
[80]Jaffe A B, Hall A: Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol, 21: 247–269 (2005)
[81]Jank T, Aktories K: Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol, 16: 222–229 (2008)
[82]Johnson S, Gerding D N: Clostridium difficile--associated diarrhea. Clin Infect Dis, 26: 1027-34; quiz 1035-6 (1998)
[83]Judith Sailer: Combining pharmacological inhibitors of folding Combining pharmacological inhibitors of folding enzymes to protect cells from intoxication by clostridial toxins [Master thesis]. Medical Faculty of the University of Ulm, 2020
[84]Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K: Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. Nature, 375: 500–503 (1995)
[85]Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, Eichel-Streiber C von, Mann M, Aktories K: The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. J Biol Chem, 270: 13932–13936 (1995)
[86]Kaiser E, Böhm N, Ernst K, Langer S, Schwan C, Aktories K, Popoff M, Fischer G, Barth H: FK506-binding protein 51 interacts with Clostridium botulinum C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. Cell Microbiol, 14: 1193–1205 (2012)
[87]Knapp O, Benz R, Gibert M, Marvaud J C, Popoff M R: Interaction of Clostridium perfringens iota-toxin with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia. J Biol Chem, 277: 6143–6152 (2002)
[88]Knapp O, Benz R, Popoff M R: Pore-forming activity of clostridial binary toxins. Biochim Biophys Acta, 1858: 512–525 (2016)

[89]Korbmacher M, Fischer S, Landenberger M, Papatheodorou P, Aktories K, Barth H: Human α-Defensin-5 Efficiently Neutralizes Clostridioides difficile Toxins TcdA, TcdB, and CDT. Front Pharmacol, 11: 1204 (2020)
[90]Krantz B A, Trivedi A D, Cunningham K, Christensen K A, Collier R J: Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. J Mol Biol, 344: 739–756 (2004)
[91]Krantz B A, Finkelstein A, Collier R J: Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. J Mol Biol, 355: 968–979 (2006)
[92]Kreidler A-M, Benz R, Barth H: Chloroquine derivatives block the translocation pores and inhibit cellular entry of Clostridium botulinum C2 toxin and Bacillus anthracis lethal toxin. Arch Toxicol, 91: 1431–1445 (2017)
[93]Kuehne S A, Cartman S T, Heap J T, Kelly M L, Cockayne A, Minton N P: The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection. Nature, 467: 711–713 (2010)
[94]Kuehne S A, Collery M M, Kelly M L, Cartman S T, Cockayne A, Minton N P: Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic Clostridium difficile strain. J Infect Dis, 209: 83–86 (2014)
[95]Lambert G S, Baldwin M R: Evidence for dual receptor-binding sites in Clostridium difficile toxin A. FEBS Lett, 590: 4550–4563 (2016)
[96]Laoag-Fernandez J B, Fernandez A M, Maruo T: Antenatal use of ambroxol for the prevention of infant respiratory distress syndrome. J Obstet Gynaecol Res, 26: 307–312 (2000)
[97]Lawson P A, Citron D M, Tyrrell K L, Finegold S M: Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe, 40: 95–99 (2016)
[98]Lee C S, Jang Y Y, Song J S, Song J H, Han E S: Ambroxol inhibits peroxynitrite-induced damage of alpha1-antiproteinase and free radical production in activated phagocytic cells. Pharmacol Toxicol, 91: 140–149 (2002)
[99]Lee S H, Bajracharya R, Min J Y, Han J-W, Park B J, Han H-K: Strategic Approaches for Colon Targeted Drug Delivery: An Overview of Recent Advancements. Pharmaceutics, 12 (2020)
[100] Leffler A, Reckzeh J, Nau C: Block of sensory neuronal Na+ channels by the secreolytic ambroxol is associated with an interaction with local anesthetic binding sites. Eur J Pharmacol, 630: 19–28 (2010)
[101] Lessa F C, Mu Y, Bamberg W M, Beldavs Z G, Dumyati G K, Dunn J R, Farley M M, Holzbauer S M, Meek J I, Phipps E C, Wilson L E, Winston L G, Cohen J A, Limbago B M, Fridkin S K, Gerding D N, McDonald L C: Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med, 372: 825–834 (2015)
[102] Lübbert C, John E, Müller L von: Clostridium difficile infection: guideline-based diagnosis and treatment. Dtsch Arztebl Int, 111: 723–731 (2014)
[103] Lübbert C, Zimmermann L, Borchert J, Hörner B, Mutters R, Rodloff A C: Epidemiology and Recurrence Rates of Clostridium difficile Infections in Germany: A Secondary Data Analysis. Infect Dis Ther, 5: 545–554 (2016)

[104] Maegawa G H B, Tropak M B, Buttner J D, Rigat B A, Fuller M, Pandit D, Tang L, Kornhaber G J, Hamuro Y, Clarke J T R, Mahuran D J: Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease*. J Biol Chem, 284: 23502–23516 (2009)

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

[106] Malerba M, Ragnoli B: Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 4: 1119–1129 (2008)

[107] Marinov B, Jekova N, Andreeva A, Hitrova S: Antenatal ambroxol administration for prevention of respiratopry distress syndrome in preterm infants: preliminary report. Akush Ginekol (Sofiia), 50: 17–22 (2011)

[108] Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M: LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. Journal of Cell Science, 124: 548–555 (2011)

[109] McCormack J, Welsh N J, Braga V M M: Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators. Journal of Cell Science, 126: 379–391 (2013)

[110] McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau K-Y, Hughes D, Mehta A, Foltynie T, Cooper J M, Abramov A Y, Gegg M, Schapira A H V: Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. Brain, 137: 1481–1495 (2014)

[111] McNeil P L, Kirchhausen T: An emergency response team for membrane repair. Nat Rev Mol Cell Biol, 6: 499–505 (2005)

[112] Meloun M, Syrový T, Vrána A: The thermodynamic dissociation constants of ambroxol, antazoline, naphazoline, oxymetazoline and ranitidine by the regression analysis of spectrophotometric data. Talanta, 62: 511–522 (2004)

[113] Mey C de, Peil H, Kölsch S, Bubeck J, Vix J-M: Efficacy and safety of ambroxol lozenges in the treatment of acute uncomplicated sore throat. EBM-based clinical documentation. Arzneimittelforschung, 58: 557–568 (2008)

[114] Mezzetti M, Colombo L, Marini M G, Crusi V, Pierfederici P, Mussini E: A pharmacokinetic study on pulmonary tropism of ambroxol in patients under thoracic surgery. J Emerg Surg Intensive Care, 13: 179–185 (1990)

[115] Migdalska-Richards A, Daly L, Bezard E, Schapira A H V: Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α-synuclein transgenic mice. Ann Neurol, 80: 766–775 (2016)

[116] Mock M, Halfmann A, Herrmann M, von Müller L: Aktuelles zur Epidemiologie von Clostridium difficile – Bericht aus dem Konsiliarlabor C. difficile. Epidemiologisches Bulletin, 26 (2013)

[117] Moorman J P, Luu D, Wickham J, Bobak D A, Hahn C S: A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. Oncogene, 18: 47–57 (1999)

[118] Mullin S, Smith L, Lee K, D'Souza G, Woodgate P, Elflein J, Hällqvist J, Toffoli M, Streeter A, Hosking J, Heywood W E, Khengar R, Campbell P, Hehir J, Cable S, Mills K,

Zetterberg H, Limousin P, Libri V, Foltynie T, Schapira A H V: Ambroxol for the Treatment of Patients With Parkinson Disease With and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations: A Nonrandomized, Noncontrolled Trial. JAMA Neurol, 77: 427–434 (2020)

[119] Nagahama M, Nagayasu K, Kobayashi K, Sakurai J: Binding component of Clostridium perfringens iota-toxin induces endocytosis in Vero cells. Infect Immun, 70: 1909–1914 (2002)

[120] Nagahama M, Umezaki M, Oda M, Kobayashi K, Tone S, Suda T, Ishidoh K, Sakurai J: Clostridium perfringens Iota-Toxin b Induces Rapid Cell Necrosis ▿ . Infect Immun, 79: 4353–4360 (2011)

[121] Na X, Kim H, Moyer M P, Pothoulakis C, LaMont J T: gp96 Is a Human Colonocyte Plasma Membrane Binding Protein for Clostridium difficile Toxin A ▿ . Infect Immun, 76: 2862–2871 (2008)

[122] Neumeyer T, Schiffler B, Maier E, Lang A E, Aktories K, Benz R: Clostridium botulinum C2 toxin. Identification of the binding site for chloroquine and related compounds and influence of the binding site on properties of the C2II channel. J Biol Chem, 283: 3904–3914 (2008)

[123] Nieland J: Charakterisierung der Clostridium difficile Transferase b an kultivierten Säugetierzellen. Universität Ulm, 2020

[124] Nölke T, Schwan C, Lehmann F, Østevold K, Pertz O, Aktories K: Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like Clostridium difficile transferase (CDT). Proc Natl Acad Sci U S A, 113: 7870–7875 (2016)

[125] Olivieri D, Zavattini G, Tomasini G, Daniotti S, Bonsignore G, Ferrara G, Carnimeo N, Chianese R, Catena E, Marcatili S: Ambroxol for the prevention of chronic bronchitis exacerbations: long-term multicenter trial. Protective effect of ambroxol against winter semester exacerbations: a double-blind study versus placebo. Respiration, 51 Suppl 1: 42–51 (1987)

[126] Ottlinger M E, Lin S: Clostridium difficile toxin B induces reorganization of actin, vinculin, and talin in cultured cells. Experimental Cell Research, 174: 215–229 (1988)

[127] Ottonello L, Arduino N, Bertolotto M, Dapino P, Mancini M, Dallegri F: In vitro inhibition of human neutrophil histotoxicity by ambroxol: evidence for a multistep mechanism. Br J Pharmacol, 140: 736–742 (2003)

[128] Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerek S, Guttenberg G, Aktories K: Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. PLoS One, 5: e10673 (2010)

[129] Papatheodorou P, Carette J E, Bell G W, Schwan C, Guttenberg G, Brummelkamp T R, Aktories K: Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin Clostridium difficile transferase (CDT). Proc Natl Acad Sci U S A, 108: 16422–16427 (2011)

[130] Peng Z, Jin D, Kim H B, Stratton C W, Wu B, Tang Y-W, Sun X: Update on Antimicrobial Resistance in Clostridium difficile: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. J Clin Microbiol, 55: 1998–2008 (2017)

[131] Perelle S, Scalzo S, Kochi S, Mock M, Popoff M R: Immunological and functional comparison between Clostridium perfringens iota toxin, C. spiroforme toxin, and anthrax toxins. FEMS Microbiol Lett, 146: 117–121 (1997)
[132] Poole P, Chong J, Cates C J: Mucolytic agents versus placebo for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease. Cochrane Database Syst Rev: CD001287 (2015)
[133] Popoff M R, Rubin E J, Gill D M, Boquet P: Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. Infect Immun, 56: 2299–2306 (1988)
[134] Qa'Dan M, Spyres L M, Ballard J D: pH-induced conformational changes in Clostridium difficile toxin B. Infect Immun, 68: 2470–2474 (2000)
[135] Raetz C R H, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem, 71: 635–700 (2002)
[136] Ramachandran G: Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. Virulence, 5: 213–218 (2014)
[137] Rao K, Micic D, Natarajan M, Winters S, Kiel M J, Walk S T, Santhosh K, Mogle J A, Galecki A T, LeBar W, Higgins P D R, Young V B, Aronoff D M: Clostridium difficile ribotype 027: relationship to age, detectability of toxins A or B in stool with rapid testing, severe infection, and mortality. Clin Infect Dis, 61: 233–241 (2015)
[138] Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schrattenholz A, Schild H, Eichel-Streiber C von: Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B. Nature, 446: 415–419 (2007)
[139] Reuner K H, Presek P, Boschek C B, Aktories K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. Eur J Cell Biol, 43: 134–140 (1987)
[140] Riggs M M, Sethi A K, Zabarsky T F, Eckstein E C, Jump R L P, Donskey C J: Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. Clin Infect Dis, 45: 992–998 (2007)
[141] Roeder M: Der spezifische Porenblocker AMBnTbeta-CD hemmt die Zellvergiftung durch Clostridium difficile Transferase und Diphtherie-Toxin. Universität Ulm, 2015
[142] Romanini B M, Sandri M G, Tosi M, Mezzetti M, Mazzetti A: Ambroxol for prophylaxis and treatment of bronchopulmonary complications after chest surgery. Int J Clin Pharmacol Res, 6: 123–127 (1986)
[143] Rupnik M, Wilcox M H, Gerding D N: Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol, 7: 526–536 (2009)
[144] Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K: Clostridium perfringens iota-toxin: structure and function. Toxins (Basel), 1: 208–228 (2009)
[145] Schmid A, Benz R, Just I, Aktories K: Interaction of Clostridium botulinum C2 toxin with lipid bilayer membranes. Formation of cation-selective channels and inhibition of channel function by chloroquine. J Biol Chem, 269: 16706–16711 (1994)
[146] Schnell L, Felix I, Müller B, Sadi M, Bank F von, Papatheodorou P, Popoff M R, Aktories K, Waltenberger E, Benz R, Weichbrodt C, Fauler M, Frick M, Barth H:

Revisiting an old antibiotic: bacitracin neutralizes binary bacterial toxins and protects cells from intoxication. FASEB J, 33: 5755–5771 (2019)

[147] Schutz A, Gund H-J, Pschorn U, Aicher B, Peil H, Müller A, Mey C de, Gillissen A: Local anaesthetic properties of ambroxol hydrochloride lozenges in view of sore throat. Clinical proof of concept. Arzneimittelforschung, 52: 194–199 (2002)

[148] Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K: Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog, 5: e1000626 (2009)

[149] Schwan C, Kruppke A S, Nölke T, Schumacher L, Koch-Nolte F, Kudryashev M, Stahlberg H, Aktories K: Clostridium difficile toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. Proc Natl Acad Sci U S A, 111: 2313–2318 (2014)

[150] Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K: Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. Biochemistry, 37: 5296–5304 (1998)

[151] Seifart C, Clostermann U, Seifart U, Müller B, Vogelmeier C, Wichert P von, Fehrenbach H: Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment. Toxicol Appl Pharmacol, 203: 27–35 (2005)

[152] Silveira C R A, MacKinley J, Coleman K, Li Z, Finger E, Bartha R, Morrow S A, Wells J, Borrie M, Tirona R G, Rupar C A, Zou G, Hegele R A, Mahuran D, MacDonald P, Jenkins M E, Jog M, Pasternak S H: Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. BMC Neurol, 19: 20 (2019)

[153] Slimings C, Riley T V: Antibiotics and hospital-acquired Clostridium difficile infection: update of systematic review and meta-analysis. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 69: 881–891 (2014)

[154] Stiles B G, Hale M L, Marvaud J C, Popoff M R: Clostridium perfringens iota toxin: characterization of the cell-associated iota b complex. Biochem J, 367: 801–808 (2002)

[155] Stiles B G, Wigelsworth D J, Popoff M R, Barth H: Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. Front Cell Infect Microbiol, 1: 11 (2011)

[156] Tamaoki J, Chiyotani A, Yamauchi F, Takeuchi S, Takizawa T: Ambroxol inhibits Na+ absorption by canine airway epithelial cells in culture. J Pharm Pharmacol, 43: 841–843 (1991)

[157] Tao L, Zhang J, Meraner P, Tovaglieri A, Wu X, Gerhard R, Zhang X, Stallcup W B, Miao J, He X, Hurdle J G, Breault D T, Brass A L, Dong M: Frizzled are colonic epithelial receptors for Clostridium difficile toxin B. Nature, 538: 350–355 (2016)

[158] Teneberg S, Lönnroth I, Torres López J F, Galili U, Halvarsson M O, Angström J, Karlsson K A: Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding Clostridium difficile toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. Glycobiology, 6: 599–609 (1996)

[159] Tyrakowski T, Sedlaczek A, Greczko I, Bartłomowicz M, Wojciechowska M: Ambroxol effect on transepithelial electrical potential difference of isolated tracheal wall. Pol J Pharmacol, 49: 53–58 (1997)

[160] Tyrakowski T, Greczko I, Sedlaczek A, Banach B, Bartłomwicz M, Wojciechowska M, Binkowska I, Chojnacka H: Electrophysiological investigation of the effects of ambroxol on the transepithelial Na+ ion transport pathway in airways. Pol J Pharmacol, 50: 31–38 (1998)

[161] Vandekerckhove J, Schering B, Bärmann M, Aktories K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates cytoplasmic beta/gamma-actin in arginine 177. J Biol Chem, 263: 696–700 (1988)

[162] von Eichel-Streiber C, Boquet P., Sauerborn M, Thelestam M: Large clostridial cytotoxins — a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends Microbiol, 4: 375–382 (1996)

[163] Vonberg R-P, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S, Gastmeier P: Costs of nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhoea. Journal of Hospital Infection, 70: 15–20 (2008)

[164] Wang S, Huang D, Ma Q, Chen X: Does ambroxol confer a protective effect on the lungs in patients undergoing cardiac surgery or having lung resection? Interact Cardiovasc Thorac Surg, 18: 830–834 (2014)

[165] Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald L C: Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet, 366: 1079–1084 (2005)

[166] Weaver T E, Na C-L, Stahlman M: Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. Semin Cell Dev Biol, 13: 263–270 (2002)

[167] Wegner A, Aktories K: ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. J Biol Chem, 263: 13739–13742 (1988)

[168] Weiser T, Wilson N: Inhibition of tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na(+) channels by the secretolytic ambroxol. Mol Pharmacol, 62: 433–438 (2002)

[169] WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019. www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019 (20.2.2021)

[170] Wigelsworth D J, Ruthel G, Schnell L, Herrlich P, Blonder J, Veenstra T D, Carman R J, Wilkins T D, van Nhieu G T, Pauillac S, Gibert M, Sauvonnet N, Stiles B G, Popoff M R, Barth H: CD44 Promotes intoxication by the clostridial iota-family toxins. PLoS One, 7: e51356 (2012)

[171] Wu X, Li S, Zhang J, Zhang Y, Han L, Deng Q, Wan X: Meta-analysis of high doses of ambroxol treatment for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome based on randomized controlled trials. J Clin Pharmacol: 1199–1206 (2014)

[172] Yang B, Yao D F, Ohuchi M, Ide M, Yano M, Okumura Y, Kido H: Ambroxol suppresses influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels. Eur Respir J, 19: 952–958 (2002)

[173] Yen F T, Mann C J, Guermani L M, Hannouche N F, Hubert N, Hornick C A, Bordeau V N, Agnani G, Bihain B E: Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. Biochemistry, 33: 1172–1180 (1994)

[174] Yuan P, Zhang H, Cai C, Zhu S, Zhou Y, Yang X, He R, Li C, Guo S, Li S, Huang T, Perez-Cordon G, Feng H, Wei W: Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for Clostridium difficile toxin B. Cell Res, 25: 157–168 (2014)

[175] Zaiss N H, Weile J, Ackermann G, Kuijper E J, Witte W, Nuebel U: A case of Clostridium difficile-associated disease due to the highly virulent clone of Clostridium difficile PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. Weekly releases (1997–2007), 12 (2007)

[176] Zhu Z, Schnell L, Müller B, Müller M, Papatheodorou P, Barth H: The Antibiotic Bacitracin Protects Human Intestinal Epithelial Cells and Stem Cell-Derived Intestinal Organoids from Clostridium difficile Toxin TcdB. Stem Cells Int, 2019 (2019)

III. Danksagung

(aus Gründen des Datenschutzes entfernt)

IV. Lebenslauf

(aus Gründen des Datenschutzes entfernt)