Universitätsklinikum Ulm

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE, PROF. DR. PETER GIERSCHIK

# Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen die Toxine von *Clostridium difficile* aus humanem Hämofiltrat

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Philipp Alexander Gauckler

geboren in Stuttgart

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 19.04.2018

# I Inhaltsverzeichnis

**I Inhaltsverzeichnis ..... I**

**II Abkürzungsverzeichnis ..... II**

**1 Einleitung ..... 1**

*1.1 Das Bakterium Clostridium difficile ..... 1*

*1.2 Bakterielle Toxine ..... 3*

*1.3 Struktur und Wirkmechanismus der AB-Toxine ..... 4*

*1.4 Die einkettigen AB-Toxine Toxin A und Toxin B ..... 5*

*1.5 Clostridium difficile Transferase (CDT) und verwandte binäre AB-Toxine ..... 10*

*1.6 Die Peptidbank ..... 16*

*1.7 Zielsetzung der Arbeit ..... 19*

**2 Material und Methoden ..... 21**

*2.1 Material ..... 21*

*2.1.1 Geräte und wiederverwendbare Materialien ..... 21*

*2.2.2 Verbrauchsmaterialien ..... 22*

*2.1.3 Chemikalien ..... 23*

*2.1.4 Eukaryotische Zelllinien ..... 25*

*2.1.5 Medien und Zusätze zur Arbeit mit Zellkulturen ..... 26*

*2.1.6 Häufig verwendete Puffer ..... 26*

*2.1.7 Verwendete bakterielle Toxine ..... 28*

*2.1.8 Verwendete Software ..... 29*

*2.2 Methoden ..... 29*

*2.2.1 Umgang mit der Peptidbank ..... 29*

*2.2.2 Zellkultivierung ..... 30*

*2.2.3 Zellvergiftungsversuche ..... 31*

*2.2.4 Herstellung von Zelllysat und Proteinkonzentrationsbestimmung ..... 33*

*2.2.5 Untersuchung der in vitro Enzymaktivität ..... 33*

*2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..... 34*

*2.2.7 Western-Blot ..... 35*

*2.2.8 Toxin-Translokationsversuche ..... 36*

*2.2.9 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und statistische Auswertung ..... 38*

**3 Ergebnisse ..... 39**

*3.1 Identifizierung und Charakterisierung inhibitorischer Peptide gegen Toxin A ..... 39*

*3.1.1 Primärscreening der Peptidbank (Charge 050905) zur Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen Toxin A ..... 39*

*3.1.2 Überprüfung der auffälligen Peptidfraktionen aus dem Primärscreening ..... 42*

*3.2 Identifizierung und Charakterisierung inhibitorischer Peptide gegen das Toxin CDT ..... 45*

*3.2.1 Primärscreening der Peptidbank (Charge 040823) zur Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen CDT ..... 45*

*3.2.2 Überprüfung der auffälligen Peptidfraktionen aus dem Primärscreening in Dreifachbestimmung ..... 47*

*3.2.3 Versuche zur Bestätigung des Hemmeffekts identifizierter Peptidfraktionen und Untersuchung der Wirkung auf andere bakterielle Toxine ..... 49*

*3.3 Verfolgung des Hemmeffekts von E6F18 auf das Toxin CDT in weiteren rechromatographischen Auftrennungszyklen ..... 56*

*3.3.1 Untersuchung der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT ..... 56*

*3.3.2 Untersuchung der zweiten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT ..... 61*

*3.3.3 Untersuchung der dritten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT ..... 64*

*3.4 Analyse des Hemmmechanismus von E6F18 (Charge 040823) ..... 68*

*3.4.1 In vitro ADP-Ribosylierungsversuche mit E6F18 (Charge 040823) und CDT ..... 68*

*3.4.2 Toxin-Translokationsversuche mit E6F18 und dem C2-Toxin ..... 71*

*3.5 Untersuchung von E6F18 auf adverse Eigeneffekte auf Vero-Zellen ..... 78*

*3.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse ..... 79*

**4 Diskussion ..... 80**

*4.1 Drei Peptidfraktionen hemmen die Zellvergiftung durch Toxin A und CDT ..... 81*

*4.2 Weiterverfolgung der Trefferfraktion E6F18 ..... 84*

*4.3 Analyse des Hemmmechanismus von E6F18 ..... 87*

*4.4 Untersuchung von E6F18 auf adverse Eigeneffekte ..... 92*

*4.5 Ausblick ..... 93*

**5 Zusammenfassung ..... 95**

**6 Literaturverzeichnis ..... 97**

**III Danksagung ..... 106**

**IV Lebenslauf ..... 107**

# II Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 027/NAP1 | Hypervirulenter *Clostridium difficile* Stamm vom Ribotyp 027 und Pulsgelelektrophoresetyp NAP1 |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMBnTßCD | Per-6-S-(3-aminomethyl)benzylthio-ß-cyclodextrin |
| ANTXR | Anthrax-Toxinrezeptor |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäuren |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C2I | A-Untereinheit des C2-Toxins |
| C2II | B-Untereinheit des C2-Toxins |
| C2IIa | Aktivierte B-Untereinheit des C2-Toxins |
| *C.* | *Clostridium* |
| CDAD | *Clostridium difficile* assoziierte Erkrankungen |
| CDI | *Clostridium difficile* Infektionen |
| CDT | *Clostridium difficile* Transferase |
| CSPG4 | *Chondroitine sulfate proteoglycan 4* |
| CST | *Clostridium spiroforme*-Toxin |
| DT | Diphtherie-Toxin |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | *Enhanced chemiluminescent* |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ExFy-L/M/S | Peptidfraktion ExFy in großer/mittlerer/kleiner Dosierung |

| | |
|---|---|
| F-Aktin | Filamentäres Aktin |
| FMT | Fäkale Mikrobiota-Transplantation |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FKBP51 | FK506-bindendes Protein 51 |
| G-Aktin | Monomeres / globuläres Aktin |
| GDP | Guanosin Diphosphat |
| GEF | *Guanine Exchange Factor* |
| GST-System | Gluthation S-Transferase-System |
| GTP | Guanosin Triphosphat |
| HD | *Human α-Defensin* |
| HF | Hämofiltrat |
| Hsp70 | Hitzeschockprotein 70 |
| Hsp90 | Hitzeschockprotein 90 |
| HNP | *Human Neutrophil Protein* |
| I | Iota-Toxin |
| InsP6 | Inositol Hexaphosphat |
| kDa | Kilo Dalton |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LSR | *Lipolysis-stimulated lipoprotein* Rezeptor |
| MAP | *Multiple antigen peptide* |
| MRSA | Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* |
| MRGN | Multiresistente gramnegative Erreger |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| PA | Protektives Antigen |
| PBS | *Phosphate Buffered Sialine* |
| PMC | Pseudomembranöse Kolitis |

| | |
|---|---|
| PVRL3 | *Poliovirus receptor-like 3* |
| RPC | *Reversed-Phase* Chromatographie |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SF | Subfraktion |
| SSF | Subsubfraktion |
| SSSF | Subsubsubfraktion |
| Strep-POD | Streptavidin-Peroxidase |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Thr37 | Threonin-37 |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| Tris | Trishydroxylmethylaminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat |
| U-PEP | Ulmer Zentrum für Peptidpharmazeutika |
| v-ATPase | Vesikuläre Protonenpumpe |
| VER | VER-155008 |
| VIRIP | *Virus-inhibitory-peptide* |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Bakterium *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile (C. difficile)* ist ein grampositives, sporenbildendes Stäbchenbakterium, welches unter anaeroben Bedingungen ubiquitär in der Natur zu finden ist und auf fäkal-oralem Weg übertragen wird. Als das Bakterium 1935 zuerst durch Hall und O'Toole im Stuhl von Neugeborenen identifiziert werden konnte ging man davon aus, dass *C. difficile* ein apathogener Keim der gesunden menschlichen Darmflora sei (Hall IC 1935). In der Tat lässt sich das Bakterium bei bis zu 70 % aller Kleinkinder im ersten Lebensjahr ohne jeglichen damit assoziierbaren Krankheitswert nachweisen. Heutzutage wird vermutet, dass Neugeborenen und Säuglingen die zum Auslösen der Krankheit notwendigen Toxinrezeptoren fehlen (Eglow et al. 1992). Den Zusammenhang zwischen *C. difficile* und nosokomialen, antibiotikaassoziierten Durchfallerkrankungen herzustellen gelang erst etwa 40 Jahre später durch Tedesco et al. und Bartlett et al. Sie identifizierten das Bakterium als Auslöser von Durchfallerkrankungen unterschiedlichster Ausprägungsform und assoziierten das Auftreten zunächst mit Antibiotikatherapien mit Clindamycin (Tedesco et al. 1974; Bartlett et al. 1978). In den folgenden Jahren konnte festgestellt werden, dass auch die Behandlung mit anderen Breitbandantibiotika wie Cephalosporine und Penicillinderivate oder neuerdings ebenso Fluorochinolone und Nicht-Antibiotika wie Protonenpumpeninhibitoren oder H2-Blocker die physiologische Darmflora derartig verändern kann, dass *C. difficile* Bakterien einen Kolonisationsvorteil erlangen. Es kommt zur konsekutiven Proliferation der Bakterien mit zunehmender Produktion bakterieller Toxine, welche schlussendlich für die Pathogenese verantwortlich gemacht werden (Bartlett et al. 1978).

Die Kolonisation der Darmmukosa mit *C. difficile* kann unterschiedlichste Folgen nach sich ziehen. Bei etwa 3 % aller gesunder Erwachsener kommt es trotz Darmbesiedlung zu keinerlei klinischer Symptomatik. Durch *C. difficile* hervorgerufene Durchfallerkrankungen werden als CDAD zusammengefasst und

reichen von milden Durchfallerkrankungen über das Bild der einfachen Kolitis bis hin zur pseudomembranösen Kolitis (PMC) (Ghose 2013). Bei der PMC handelt es sich um eine besonders schwere Verlaufsform der CDAD, die ihren Namen durch den endoskopischen Nachweis fibrinopurulenter Plaques auf der Darmmukosa erhielt und mit drastischen Komplikationen wie Darmperforationen, toxischem Megakolon bis hin zum Tode einhergehen kann (Alexander 1999).

Hinsichtlich der Epidemiologie von *C. difficile* Infektionen (CDI) kam es in den letzten Jahren zu drastischen Veränderungen. Sowohl die Inzidenz als auch der Schweregrad von CDI zeigten eine ansteigende Tendenz, was die CDAD zu einer immer größeren Herausforderung für die Gesundheitssysteme weltweit werden ließ. Beispielsweise stieg die CDI Diagnoserate hospitalisierter Patienten zum Zeitpunkt ihrer Entlassung in US-Krankenhäusern von 3,82 % pro 1000 Entlassungen im Jahr 2000 auf 8,75 % pro 1000 Entlassungen im Jahr 2009 an (Lessa et al. 2012).

Große Ausbrüche und zunehmend schwerere Verläufe der CDI sind unter anderem auf das Auftreten neuer hypervirulenter Stämme zurückzuführen. Um epidemiologische Studien durchführen zu können, wurden *C. difficile* Stämme mittels PCR-Ribotypisierung, Pulsfeldgelelektrophorese und Restriktionsendonuklease-Analyse kategorisiert. Ein bekannter hypervirulenter Stamm ist jener vom Ribotyp 027, Pulsfeldgelelektrophoresetyp NAP1 (027/NAP1). Dieser Stamm zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass er höhere Mengen der beiden AB-Toxine A und B produziert, die als Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* gelten. Zudem ist er charakterisiert durch eine erhöhte Antibiotikaresistenz und die Bildung der *Clostridium difficile* Transferase (CDT). Dabei handelt es sich um ein weiteres Toxin, welches als additiver Virulenzfaktor diskutiert wird (McDonald et al. 2005).

Auch in Deutschland konnte in epidemiologischen Studien das Auftreten des hyperviruleten Epidemiestammes vom Ribotyp 027 als Auslöser besonders schwerer nosokomialer CDI mit einem deutschlandweiten Nord-Süd-Trend nachgewiesen werden. Seit Herbst 2007 sind schwer verlaufende bzw. rekurrierende CDI in Deutschland als bedrohliche Krankheiten mit schwerwiegender Gefahr für die Allgemeinheit zu werten und unterstehen der ärztlichen Meldepflicht nach §6 IfSG (Seedat u. Marcus 2013).

## 1.2 Bakterielle Toxine

Die bakteriellen Toxine von *C. difficile* sind maßgeblich für den Pathomechanismus der CDI verantwortlich und Grundbestandteil der hier vorliegenden Arbeit (Voth u. Ballard 2005).

Grundsätzlich lassen sich bakterielle Toxine in Exotoxine und Endotoxine unterscheiden. Bakterielle Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) und werden bei der Lyse untergehender gramnegativer Bakterien aus deren äußerer Zellmembran freigesetzt. Dabei kann es durch Produktion endogener Entzüdungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und verschiedener Interleukine zur überschießenden Immunreaktion bis hin zum tödlichen septischen Schock mit Multiorganversagen kommen (Raetz u. Whitfield 2002).

Exotoxine hingegen sind Peptide oder Proteine, die von intakten pathogenen Bakterien produziert und in ihre Umgebung sezerniert werden. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe von Molekülen, die unterschiedlichste Krankheitsbilder auslösen können, jedoch für die Bakterien selbst nicht lebensnotwendig sind. Anhand ihrer Wirkungsweise werden drei Typen von Exotoxinen unterschieden: (a) Porenbildende Toxine, die ihren pathogenen Effekt durch Lyse der Zielzellmembran erreichen, (b) Toxine mit Ligandenaktivität, die als Superantigene sehr wirksam T-Lymphozyten aktivieren und (c) Toxine, die durch exogene Rezeptorbindung intrazelluläre Signalwege aktivieren.

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Toxine gehören der dritten Gruppe an. Beispiele für intrazellulär wirkende Bakterientoxine (c) sind solche mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität, wie das Diphtherie-Toxin (DT) von *Corynebacterium diphtheriae*, das C2-Toxin von *Clostridium botulinum,* CDT von *C. difficile* oder jene mit Glycosyltransferaseaktivität, wie Toxin A und B von *C. difficile*. Intrazellulär wirkende Exotoxine, die von ihren Zielzellen aufgenommen werden und in deren Zytoplasma enzymatische Substratmodifikationen vornehmen, werden auch AB-Toxine genannt (Barth 2013).

## 1.3 Struktur und Wirkmechanismus der AB-Toxine

Bei der Suche nach einem Peptidhemmstoff gegen bakterielle AB-Toxine ist die Kenntnis über den präzisen Aufnahme- und Wirkmechanismus des jeweiligen Toxins von größter Relevanz. Untersuchungen hinsichtlich des Wirkmechanismus eines Hemmstoffes lassen sich erst dann sinnvoll durchführen, wenn die einzelnen Schritte der Toxinprozessierung genauestens bekannt und verstanden sind. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Toxine zur Gruppe der AB-Toxine zählen, soll zunächst ein allgemeiner Überblick erfolgen, bevor die relevanten Toxine im Detail betrachtet werden.

Allen AB-Toxinen ist gemein, dass sie eine enzymatisch aktive A-Domäne besitzen, sowie eine B-Domäne, die der spezifischen Rezeptorbindung dient. Beide sind für das Prozessieren des Toxins in das Zytosol der Zielzelle essentiell. Befinden sich A- und B-Domäne auf einem Molekül, wie es bei Toxin A und Toxin B von *C. difficile* der Fall ist, spricht man von einkettigen AB-Toxinen (Jank u. Aktories 2008). Besteht das Toxin aus zwei separaten Proteinen, die nur in gemeinsamer Anwesenheit wirken können, bezeichnet man diese als binäre AB-Toxine. Vertreter der binären AB-Toxine sind beispielsweise CDT und das C2-Toxin (Barth et al. 2004).

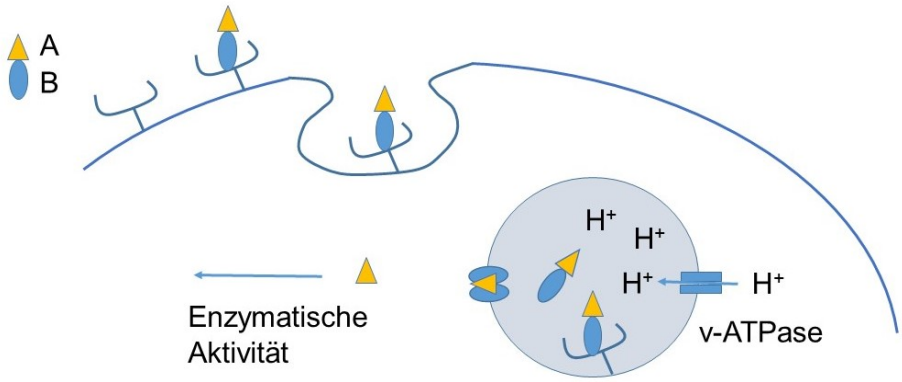



**Abb. 1: Aufnahmemechanismus bakterieller AB-Toxine am Beispiel eines einkettigen AB-Toxins.**

Das Toxin wird nach seiner Bindung über die B-Domäne durch rezeptorvermittelte Endozytose in das frühe Endosom aufgenommen. Ansäuern des Endosoms über die v-ATPase bewirkt eine Konformationsänderung des Toxin-Moleküls mit konsekutiver Membraneinlagerung und Porenbildung. So kann die enzymatisch aktive A-Domäne proteolytisch abgespalten und ins Zytosol transloziert werden, wo es zur spezifischen Substratmodifikation kommt.

Gleichwohl ob es sich um ein binäres oder ein einkettiges Toxin handelt kommt es beim stereotypen Aufnahmemechanismus aller AB-Toxine stets zunächst zur Rezeptorbindung der B-Domäne auf der Zielzellmembran. Daraufhin gelangt das gesamte Toxin bzw. der Toxin-Rezeptor-Komplex über rezeptorvermittelte Endozytose in das frühe Endosom. Hinsichtlich des folgenden Translokationsprozesses werden sogenannte „*long-trip*“ Toxine, die retrograd vom Endosom über das trans-Golgi-Netzwerk und den Golgi Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert werden müssen, von den „*short-trip*“ Toxinen, die direkt aus dem frühen Endosom ins Zytosol gelangen, unterschieden. Das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* ist ein exemplarischer Vertreter der „long-trip“ Toxine (Wernick et al. 2010).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Toxine zählen zu den „*short-trip*“ Toxinen. Damit die enzymatisch aktive A-Domäne vom frühen Endosom in das Zytosol geschleust werden kann, muss es zunächst zum Ansäuern des Endosoms über eine vesikuläre Protonenpumpe (v-ATPase) kommen. Dadurch induzierte Konformationsänderungen im Toxinmolekül ermöglichen den weiteren Translokationsprozess über die Lipidmembran, der sich jedoch zwischen den verschiedenen Toxinen deutlich unterscheiden kann (Barth et al. 2001). Im Falle eines einkettigen AB-Toxins muss es während des Translokationsprozesses zusätzlich zur proteolytischen Abspaltung der enzymatisch aktiven Untereinheit vom restlichen Toxinmolekül kommen, da nur diese das Zytosol erreicht. Im Zytosol angekommen kann die A-Domäne ihre substratspezifische enzymatische Aktivität ausüben und den jeweiligen toxintypischen zytopathischen Effekt hervorrufen.

## 1.4 Die einkettigen AB-Toxine Toxin A und Toxin B

Toxin A und B gelten als die beiden Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* und zählen zusammen mit den Toxinen der beiden Gasbrand Erreger *Clostridium sordellii* (letales Toxin und hämorrhagisches Toxin) und *Clostridium novyi* (α–Toxin) zur Familie der clostridialen glykosylierenden Toxine (Voth u. Ballard 2005; Just u. Gerhard 2004). Bei all diesen Toxinen handelt es sich um sehr große bakterielle Exotoxine mit einer Molekülmasse zwischen 250 und 308 kDa, die ihre potenten

zytopathogenen Effekte durch die Glykosylierung von Rho-Proteinen im Zytosol ihrer Zielzellen herbeiführen (von Eichel-Streiber et al. 1996; Just et al. 1995).

Die kodierenden Gene tcdA und tcdB der beiden Toxine liegen zusammen auf einem gemeinsamen Pathogenitätslokus und zeigen mit 63 % Übereinstimmung der Aminosäuren (AS) eine hohe Gesamthomologie. Die strukturelle und funktionelle Homologie der beiden Toxine deutet darauf hin, dass beide Gene möglicherweise durch Genduplikation und anschließende Rekombination und Mutation entstanden sind (von Eichel-Streiber et al. 1992). Das Gen tcdC liegt im selben Pathogenitätslokus und fungiert als negativer Regulator für die Expression von tcdA und tcdB. Im hypervirulenten Stamm 027/NAP1 konnten Deletionen im tcdC Gen erkannt werden, was die beobachtete verstärkte Produktion von Toxin A und B erklären könnte (McDonald et al. 2005).

### 1.4.1 Die Toxinstruktur und der spezifische Aufnahmemechanismus

Der Aufbau von Toxin A und B entspricht dem klassischen Modell der AB-Toxine. Die C-terminal lokalisierte B-Domäne vermittelt die Rezeptorbindung, während der N-Terminus die biologisch aktive A-Domäne trägt. Zwischen den beiden Domänen liegt eine hydrophobe Region, welche für den Translokationsprozess und die Porenbildung im frühen Endosom verantwortlich gemacht wird. Diese Kenntnis führte zur Idee eines dreigliedrigen Molekülaufbaus (Just u. Gerhard 2004). Jüngere Studien legen nahe dieses Modell zu erweitern. Erst im Jahr 2007 wurde ein Bereich in Toxin B entdeckt, welcher als autokatalytische Protease fungiert und für die Abtrennung der A-Domäne bei dessen Translokation ins Zytosol zuständig zu sein scheint (Reineke et al. 2007).

Dies führt zu einem neuen ABCD-Modell, nach welchem die großen clostridialen glykosylierenden Toxine in die biologisch aktive A-Domäne (*activity*), die B-Domäne (*binding*) zur Rezeptorbindung, die autokatalytische C-Domäne (*cleavage*) und die Translokation vermittelnde D-Domäne (*delivery*) beschrieben werden können (Jank u. Aktories 2008).




**Abb. 2: Strukturmodell der Toxindomänen für clostridiale glykosylierende Toxine am Beispiel von Toxin B.**

Die biologisch aktive A-Domäne liegt am N-Terminus (Aminosäuren (AS) 1-543). Benachbart dazu befindet sich die C-Domäne (AS 543-767), eine erst kürzlich entdeckte, autokatalytisch wirksame Protease. Die D-Domäne (AS 767-1852) beherbergt eine kurze hydrophobe Region im Mittelteil des Toxinmoleküls (AS 965-1128), die ihre Funktion vermutlich bei der endosomalen Porenbildung und Translokation des Toxins in das Zytosol hat. Über die B-Domäne am C-Terminus (AS 1852-2366) erfolgt die Rezeptorbindung des Toxinmoleküls an die Zielzelle.

#### 1.4.1.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Zu Beginn der Toxinaufnahme in die Zielzelle steht die Rezeptorbindung. Die Identifikation der Rezeptoren über welche die beiden Toxine A und B ihren zytopathogenen Effekt vermitteln, war Gegenstand intensiver Forschung der vergangenen Jahre. Schon vor geraumer Zeit lieferten Untersuchungen mit Toxin A unter anderem verschiedene Blutgruppenantigene und das nicht-proteinerge Saccharidmolekül Galα1-3Galβ1-4GlcNAc, welche die Zellbindung des Toxins vermitteln (Voth u. Ballard 2005; Krivan et al. 1986; Tucker u. Wilkins 1991). Toxin B agiert jedoch neueren Erkenntnissen zu Folge auf eine andere Weise (Chaves-Olarte et al. 1997; Dingle et al. 2008). Lange war über den Zellrezeptor von Toxin B wenig bekannt, bis kürzlich zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander jeweils verschiedenartige Rezeptormoleküle für Toxin B identifizieren konnten. Sowohl *Chondroitine sulfate proteoglycan 4* (CSPG4), als auch *Poliovirus receptor-like 3* (PVRL3) sind an der Zellbindung von Toxin B beteiligt. Interessanterweise binden beide Moleküle Toxin B außerhalb seiner eigentlichen Rezeptorbindungsdomäne (Yuan et al. 2015; LaFrance et al. 2015). Die konsekutive Endozytose des Toxin-Rezeptorkomplexes erfolgt bei beiden Toxinen in Abhängigkeit von Clathrin (Papatheodorou et al. 2010).

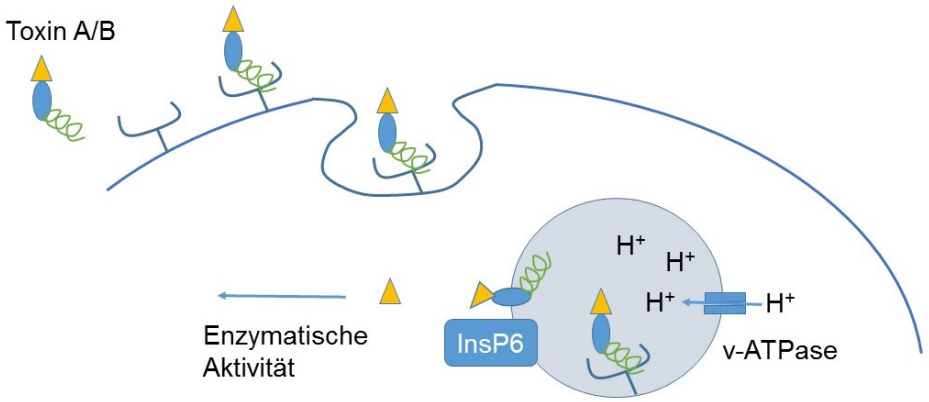



**Abb. 3: Zellulärer Aufnahmemechanismus von Toxin A und B.**

Über die spulenförmige Rezeptorbindungsdomäne am C-Terminus des Toxins kommt es nach Bindung an einen toxinspezifischen Rezeptor zur Clathrin-vermittelten Endozytose des Toxin-Rezeptorkomplexes. Ansäuern des Endosoms über eine v-ATPase führt zur Konformationsänderung der hydrophoben Domäne des Toxins mit konsekutiver Membraneinlagerung und Porenbildung. Die auto-proteolytische Spaltung durch die C-Domäne benötigt Inositol Hexaphosphat (InsP6) als Cofaktor und führt zur Freisetzung der katalytisch aktiven A-Domäne ins Zytosol.

#### 1.4.1.2 Translokation des Toxins in das Zytosol

Damit die A-Domäne ihr Substrat im Zytosol erreichen kann, muss es zunächst zum Ansäuern des Endosoms via v-ATPase kommen. Der saure pH-Wert bewirkt eine Konformationsänderung der hydrophoben D-Domäne, die sich nun in die Lipidmembran einlagert und die Ausschleusung der A-Domäne über eine Pore vermitteln kann (Qa'Dan et al. 2000). Zum genauen Verständnis der Porenbildung ist bislang wenig bekannt, jedoch scheinen sowohl Toxin A als auch Toxin B unter pH-sauren Bedingungen und der Anwesenheit von Cholesterol dazu in der Lage zu sein (Giesemann et al. 2006).

Wie am Beispiel von Toxin B gezeigt werden konnte, befindet sich zum Schluss des Translokationsprozesses lediglich die katalytische Untereinheit des Toxinmoleküls im Zytosol. Der Mittelteil und der C-Terminus verbleiben im Endosom bzw. in dessen Lipidmembran (Pfeifer et al. 2003). Für die Abtrennung der A-Domäne während der Translokation ist die auto-proteolytische C-Domäne zuständig. Wie Untersuchungen an Toxin B nahelegen, trägt diese toxineigene Domäne eine

Protease, deren enzymatische Aktivität Inositolphosphate wie Inositol Hexaphosphat (InsP6) als Cofaktor benötigt (Reineke et al. 2007). Ob es sich bei der autokatalytischen Protease um eine Aspartat- oder eine Cystein-Protease handelt, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden und steht in widersprüchlicher Diskussion (Reineke et al. 2007; Egerer et al. 2007).

#### 1.4.1.3 Die N-terminale katalytische A-Domäne

Die N-terminalen 543 Aminosäuren von Toxin B beherbergen die Enzymdomäne mit Glykosyltransferaseaktivität, die in das Zytosol transloziert wird. Ähnlich der Rezeptorbindungsdomäne konnte auch für die katalytische Enzymdomäne die dreidimensionale Struktur durch Kristallisation anhand eines N-terminalen Fragments von Toxin B aufgeklärt werden. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus parallel ausgerichteten β-Faltblättern im aktiven Zentrum und α-Helices, die diese flankieren. Diese Faltung entspricht der einer Typ A Glykosyltransferase, ähnlich der Glucosyltransferase SpsA von *Bacillus subtilis* oder der bovinen alpha-1,3Galaktosyltransferase (Unligil u. Rini 2000; Reinert et al. 2005; Breton et al. 2006).

### 1.4.2 Glucosylierung von Rho-Proteinen

Zur Familie der Rho-Proteine gehören die kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42. Im aktiven Zustand hydrolysieren diese GTP zu GDP und geraten so in den inaktiven Zustand. Der Austausch von GDP durch GTP führt zur Reaktivierung der Rho-Proteine und wird durch sogenannte *Guanine Exchange Factors* (GEF) reguliert (Zhou et al. 1998). Im aktiven GTP-gebunden Zustand kontrollieren Rho-Proteine diverse zelluläre Signalwege und regulieren so unter anderem die Architektur des Aktin-Zytoskeletts, Membrantransportwege, die Integrität der Epithelbarriere, sowie die Zytokinproduktion (Etienne-Manneville u. Hall 2002). Clostridiale glucosylierende Toxine modifizieren Rho-Proteine an Threonin-37 (bzw. Threonin-35 in Rac1 und Cdc42) durch enzymatische Übertragung von Glucose aus dem Cosubstrat UDP-Glucose (Just et al. 1995). Die Modifikation führt zur funktionellen Inaktivierung der Rho-Proteine auf mehreren regulatorischen Ebenen

(Sehr et al. 1998). Die Effekte auf das Aktin-Zytoskelett äußern sich als auffällige Veränderungen der Zellmorphologie und lassen sich in zellexperimentellen Versuchen unter dem Mikroskop als Abrundung der Epithelzellkontur deutlich erkennen, bevor die Zellen schließlich in Apoptose übergehen.

Hinsichtlich der Pathogenese von CDAD lassen sich die Effekte der Inhibierung von Rho-Proteinen durch Glucosylierung leicht von den oben beschriebenen Funktionen der GTPasen ableiten. Die Umverteilung des Aktin-Zytoskeletts und der Verlust der Integrität der Epithelzellbarriere führen zur toxininduzierten Diarrhö (Aktories u. Barbieri 2005). Das Bild der Kolitis mit gesteigerter Entzündungsaktivität in der Darmmukosa lässt sich zuerst nicht mit der Hemmung der Zytokinproduktion in Einklang bringen. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass es durch die Glykosylierung zur vermehrten Expression der aktiven Isoform RhoB kommt. RhoB ist kein Ziel der clostridialen glucosylierenden Toxine und liefert eine mögliche Erklärung für die überschießende Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Gerhard et al. 2005; Jank et al. 2007).

## 1.5 *Clostridium difficile* Transferase (CDT) und verwandte binäre AB-Toxine

Neben Toxin A und B produziert lediglich ein Teil der *C. difficile* Stämme das binäre AB-Toxin CDT. Epidemiologische Studien zeigen, dass die in jüngster Zeit vermehrt aufgetretenen, hypervirulenten Stämme wie 027/NAP1 unter anderem durch die zusätzliche Produktion von CDT gekennzeichnet sind (Gerding et al. 2014; Ghose 2013; McDonald et al. 2005). Welche Rolle CDT für die Pathogenese der CDI genau spielt ist noch unklar. Die Erkenntnisse der letzten Jahre tragen jedoch immer weiter zum besseren Verständnis der Funktion des Toxins bei. Im Hamstermodell konnten Hinweise gefunden werden, dass Toxin A- und Toxin B-negative *C. difficile* Stämme, die lediglich CDT produzieren, keine CDAD auslösen (Geric et al. 2006). Toxin B-negative Stämme, die Toxin A und CDT produzieren hingegen scheinen virulenter zu sein, als jene die ausschließlich Toxin A produzieren (Kuehne et al. 2014). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Produktion von CDT das Rezidivrisiko

an CDI zu erkranken zu erhöhen scheint (Stewart et al. 2013). So deutet Vieles darauf hin, dass das binäre Toxin als additiver Virulenzfaktor in CDI auftritt.

CDT zählt zusammen mit dem Iota-Toxin (I) von *C. perfrigens* und dem C2-Toxin von *C. botulinum* zu den binären ADP-ribosylierenden Toxinen. CDTb, Ib und C2II entsprechen hierbei der B-Domäne und vermitteln die Rezeptorbindung, während CDTa, Ia und C2I als A-Domäne das Zytosol erreichen und für die ADP-Ribosylierung von monomerem Aktin (G-Aktin) zuständig sind (Barth et al. 2004). Dies führt zur Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts und Umstrukturierung des Mikrotubulussystems. Lange zytoplasmatische Ausläufer auf Mikrotubulusbasis sind die Folge. In vivo Studien an Mäusen zeigten, dass Darmepithelzellen durch Behandlung mit CDT ein Maschenwerk ausbilden, in dem sich *Clostridien* verfangen. Die erleichterte Darmkolonisation mit lokal erhöhter Toxinkonzentration ist die Folge (Schwan et al. 2009). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Pathogenität von hypervirulenten Stämmen, die CDT als zusätzliches Toxin produzieren.

CDTa und CDTb werden von den Genen cdtA und cdtB kodiert, welche auf einem gemeinsamen Genlokus liegen und durch das Gen cdtR reguliert werden (Perelle et al. 1997; Carter et al. 2007). Die Genprodukte CDTa und CDTb gleichen den Toxinkomponenten Ia und Ib hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz zu 80-85 % und sind untereinander gegenseitig austauschbar, was für das C2-Toxin nicht gilt. CDT wird deshalb gemeinsam mit dem *C. spiroforme*-Toxin (CST) zur Familie der *Iota-like* Toxinen gezählt und hat mit diesen hinsichtlich Struktur und Aufnahmemechanismus eine hohe Verwandtschaft. Das C2-Toxin stellt demgegenüber eine eigene Familie binärer AB-Toxine dar (Popoff et al. 1989; Gulke et al. 2001; Barth et al. 2004). Die folgenden Beschreibungen für CDT sind, soweit nicht explizit vermerkt, für das Iota-Toxin und das C2-Toxin übertragbar.

### 1.5.1 Die Toxinstruktur und der spezifische Aufnahmemechanismus

Da der Aufnahmemechanismus der binären Toxine und der einkettigen Toxine A und B teilweise sehr ähnlich ist und im vorherigen Kapitel sehr detailliert behandelt

wurde, sollen hier nur die Besonderheiten der in dieser Arbeit verwendeten Toxine CDT, Iota und C2 genauer betrachtet werden.

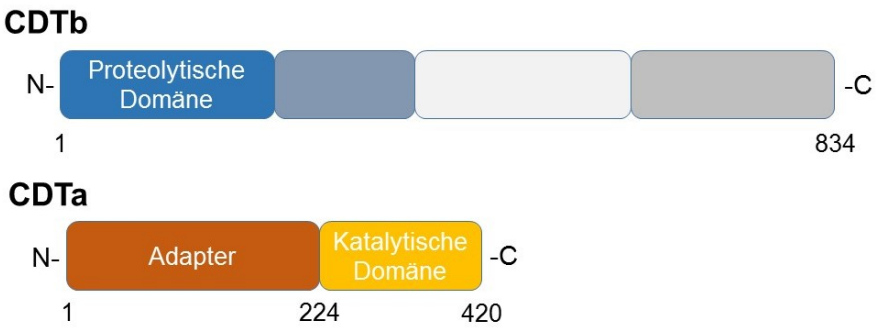



**Abb. 4: Strukturmodell der Toxindomänen von CDTa und CDTb.**

Das binäre Toxin besteht aus einer B-Domäne (CDTb) und aus einer A-Domäne (CDTa). CDTb kann, abgeleitet vom Aufbau des Protektiven Antigens (PA) von *Bacillus anthracis*, in 4 Domänen unterteilt werden und ist nach proteolytischer Aktivierung fähig zur Rezeptorinteraktion und Porenbildung. Während der N-terminale Teil von CDTa (Aminosäuren 1 bis 224) an der Interaktion mit CDTb beteiligt ist, vermittelt der C-terminale Teil (Aminosäuren 224 bis 420) die katalytische Aktivität.

Die enzymatisch aktive Komponente CDTa hat ein Molekulargewicht von 48 kDa. Die Molekülstruktur wurde kürzlich durch ein Kristallisationsverfahren aufgeklärt. Der N-terminale Teil vermittelt vermutlich die Interaktion mit CDTb, während der C-terminale Teil die katalytische Aktivität herbeiführt (Sundriyal et al. 2009). Die Rezeptorbindungskomponente CDTb hat ein Molekulargewicht von 98,8 kDa und muss zunächst durch eine Serin-Protease aktiviert werden, sodass ein 75 kDa schweres, aktiviertes CDTb-Fragment entsteht (Perelle et al. 1997). Bislang existiert keine dreidimensionale Darstellung von CDTb, jedoch konnten einige Erkenntnisse von der korrespondierenden Rezeptorbindungsstelle ähnlich aufgebauter Toxine, wie beispielsweise dem Protektiven Antigen (PA) von *Bacillus anthracis,* abgeleitet werden. Man geht von einer Struktur bestehend aus 4 Domänen aus. Von N-terminal nach C-terminal folgend, besitzt die erste Domäne eine Aktivierungsfunktion, die zweite Domäne ist zuständig für die Membraneinlagerung und Translokation, die dritte Domäne vermittelt die Oligomerisierung und die C-terminal liegende vierte Domäne gewährleistet die Rezeptorbindung (Gerding et al. 2014).

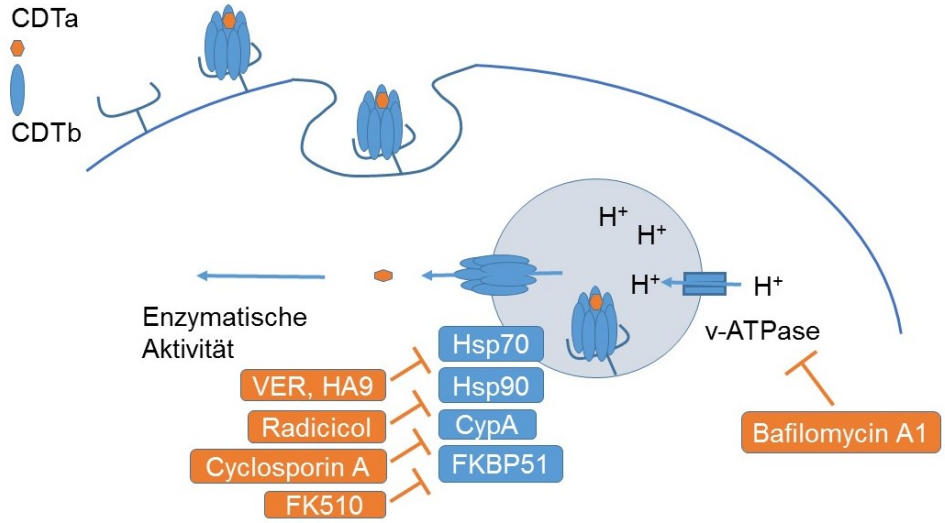



**Abb. 5: Zellulärer Aufnahmemechanismus von CDT und verwandter binärer AB-Toxine.**

Nachdem CDTa an das CDTb-Heptamer gebunden hat, kommt es zur *lipolysis-stimulated lipoprotein* Rezeptor- (LSR)-vermittelten Endozytose und Aufnahme des CDT-LSR-Komplexes in das Endosom. Das Ansäuern über die v-ATPase führt zur Konformationsänderung des CDTb-Heptamers mit konsekutiver Membraneinlagerung und Porenbildung. Die anschließende Translokation von CDTa in das Zytosol wird vermittelt über intrazelluläre Helferproteine wie die Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und 90 (Hsp90), Cyclophilin A (CypA) und das FK510-bindende Protein 51(FKBP51), die ihrerseits durch VER-155008 (VER), HA9, Radicicol, Cyclosporin A und FK510 spezifisch gehemmt werden können. Bafilomycin A1 ist ein Hemmstoff der endosomalen v-ATPase. Eine ausführliche Beschreibung wird im Text gegeben.

#### 1.5.1.1 Rezeptorvermittelte Endozytose

Sowohl das Iota-Toxin als auch CDT binden spezifisch an einen *lipolysis-stimulated lipoprotein* Rezeptor (LSR), während die Aufnahme des C2-Toxins über einen Glycoproteinrezeptor vermittelt wird (Eckhardt et al. 2000; Papatheodorou et al. 2011). Nach proteolytischer Aktivierung von CDTb, ist dieses fähig zur Formierung von Heptameren. Die Rezeptorbindung von CDTb kann entweder als Monomer oder nach Oligomerisierung in Heptamerform erfolgen. CDTa bindet nun über seine C-terminale Domäne an den oligomerisierten CDTb-LSR-Komplex. Die CDT-LSR-Komplexe sammeln sich in cholesterinhaltigen *Lipidrafts* an und es kommt zur Endozytose (Nagahama et al. 2009; Hale et al. 2004). Zusätzlich scheint das Zelloberflächenprotein CD44 als Corezeptor von LSR bei der Aufnahme von Iota, CDT und CST beteiligt zu sein, während es für die Aufnahme des C2-Toxins keine

entscheidende Rolle spielt (Wigelsworth et al. 2012). HeLa-Zellen, mit welchen einige der Versuche in dieser Arbeit durchgeführt wurden, exprimieren keine LSR und sind daher resistent gegenüber den Toxinen CDT und Iota, nicht aber gegenüber dem C2-Toxin (Papatheodorou et al. 2011).

#### 1.5.1.2 Translokation der Toxine in das Zytosol

Wie schon für die einkettigen AB-Toxine beschrieben, kommt es auch bei den binären Toxinen zum endosomalen Ansäuern. Die dadurch induzierte Konformationsänderung des Heptamers erlaubt die Einlagerung und Porenbildung in der Lipidmembran des Endosoms (Barth et al. 2000; Blocker et al. 2001; Kaiser et al. 2011). Der darauffolgende Translokationsprozess von CDTa in das Zytosol unterscheidet sich von dem der einkettigen Toxine durch das Mitwirken intrazellulärer Helferproteine. Die Hitzeschockproteine 70 (Hsp70) (AG Barth, unveröffentlichte Ergebnisse) und 90 (Hsp90), die Peptidyl-Prolyl-cis/trans Isomerase Cyclophilin A (CypA) und das FK506-bindende Protein 51 (FKBP51) scheinen an der pH-abhängigen Translokation der enzymatisch aktiven Komponenten CDTa, Ia und C2I beteiligt zu sein. Dies zeigten Zellvergiftungsversuche mit den Inhibitoren VER-155008 (VER), HA9, Radicicol, Cyclosporin A und FK506, die diese Helferproteine spezifisch hemmen und so Epithelzellen vor der Intoxikation mit unter anderem CDT schützen (Ernst et al. 2016; Haug et al. 2003; Haug et al. 2004; Kaiser et al. 2009; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2012).

Der endosomale Translokationsprozess kann durch Gabe von Bafilomycin A1, einem Hemmstoff der v-ATPase, komplett blockiert werden. Ein anschließendes extrazelluläres Ansäuern (pH ≤ 5,2) induziert die artifizielle Toxintranslokation auf direktem Wege über die Zellmembran in das Zytosol unter Aussparung der endosomalen Aufnahme (Barth et al. 2001).

### 1.5.2 ADP-Ribosylierung von G-Aktin

Im Zytosol angelangt, übt der C-terminale, enzymatisch aktive Anteil von CDTa seine Funktion als ADP-Ribosyltransferase aus. Dabei wird vom Cosubstrat Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ($NAD^+$) eine ADP-Ribose auf G-Aktin an Arginin-177 übertragen (Gulke et al. 2001; Vandekerckhove et al. 1987). Wie eine Kappe setzt sich das ADP-ribosylierte G-Aktin an das Plus-Ende der Aktinfilamente und verhindert so deren weiteren Aufbau. Das Minus-Ende hingegen, an dem die Depolymerisation stattfindet, verbleibt unverändert und das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der Filamente geht verloren (Wegner u. Aktories 1988). Die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts führt, vergleichbar mit dem Effekt von Toxin A und B, zur lichtmikroskopisch darstellbaren Zellabrundung und im weiteren zeitlichen Verlauf zum Caspase-abhängigen Zelltod (Hilger et al. 2009).

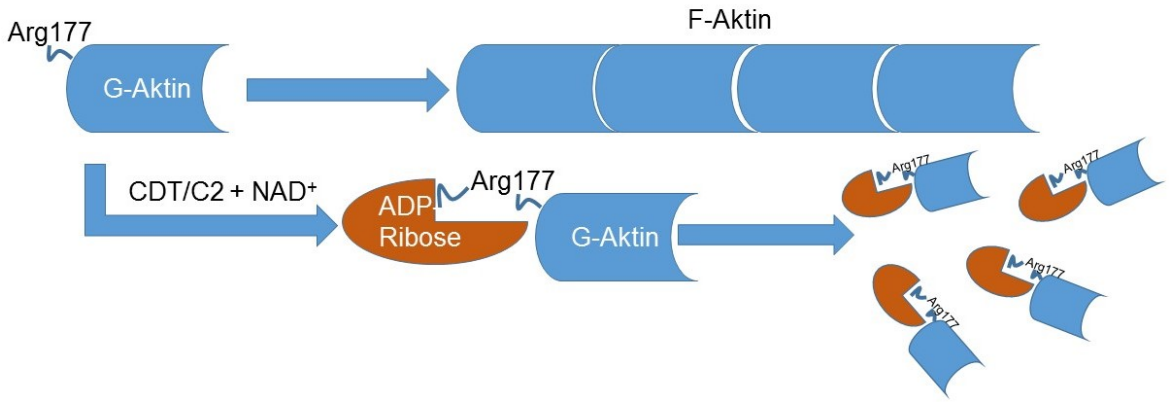



**Abb. 6: ADP-Ribosylierung von G-Aktin.**

Die binären ADP-ribosylierenden Toxine modifizieren G-Aktin an Arginin-177 (Arg177) durch Übertragung einer ADP-Ribose aus dem Cosubstrat Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ($NAD^+$). ADP-ribosyliertes G-Aktin wirkt am Plus-Ende der Aktinfilamente wie eine Kappe, die dort den weiteren Aufbau verhindert. Die Depolymerisation am Minus-Ende wird nicht gestört. Es kommt zur Degradation von F-Aktin und zur Anhäufung modifizierten G-Aktins.

Das Wachstum von Mikrotubulusstrukturen, die bis hin zur Zellmembran polymerisieren, wird gewöhnlicherweise durch das kortikale Aktinnetzwerk gestoppt. Möglicherweise induziert CDT durch die Zerstörung dieses Aktinnetzwerks so die beschriebenen Zellausläufer auf Mikrotubulusbasis (Schwan et al. 2009; Gerding et al. 2014).

Die binären ADP-ribosylierenden Toxine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Iota-Toxin und CDT ADP-ribosylieren alle Isoformen des G-Aktins unabhängig des Gewebetyps, während das C2-Toxin spezifisch die β- und γ-Isoformen in nichtmuskulärem Gewebe, sowie die γ-Isoform in glatten Muskelzellen zu modifizieren scheint (Mauss et al. 1990).

## 1.6 Die Peptidbank

Bereits 1997 entwickelte die Arbeitsgruppe um W.G. Forssmann eine Methodik zur Herstellung einer Peptidbank aus humanem Hämofiltrat (HF). Durch die Etablierung eines standardisierten Verfahrens zur Isolation und anschließenden Separation aller Peptide aus dem menschlichen Blut, sollte eine Möglichkeit geschaffen werden diese, aus pharmakologischer Sicht bislang wenig erforschte, „Schatztruhe“ bioaktiver Substanzen nun für Screeningverfahren verschiedenster naturwissenschaftlicher Fragestellungen einfach zugänglich zu machen. Ausgehend von dieser Peptidbank können nun einzelne körpereigene Peptide isoliert, charakterisiert und modifiziert werden um sie so als pharmakologischen Wirkstoff einsetzbar zu machen.

Die in diesem Projekt verwendete Peptidbank wurde durch Herrn Dr. Ludger Ständker in Zusammenarbeit mit dem Ulmer Zentrum für Peptidpharmazeutika (*Ulm Peptide Pharmaceuticals*, U-PEP) und der *pharis biotec GmbH* zur Verfügung gestellt. Zudem führte Herr Dr. Ludger Ständker die im Verlauf des Projektes notwendigen Auftrennungsgungszyklen einzelner Peptidfraktionen durch.

### 1.6.1 Herstellung und Einsatz der Peptidbank

Die Herstellung der Peptidbank erfolgte gemäß des von P. Schulz-Knappe et al. etablierten, standardisierten Verfahrens (Schulz-Knappe et al. 1997). Es folgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Arbeitsschritte zur Herstellung der Peptidbank:

Bei der routinemäßigen Dialyse chronisch niereninsuffizienter Patienten können große Mengen an humanem HF gewonnen werden. Durch Ultrafiltration werden Peptide und kleine Proteinfragmente mit einem Molekulargewicht < 30 kDa

aufgefangen. Spezifische Konzentrationen einzelner Peptide liegen in diesem Ultrafiltrat um den Faktor 1 000 erhöht vor. Zur präparativen Auftrennung und Separation des Peptidmaterials von anderen nichtpeptidergen Plasmabestandteilen wie Cholesterol, Triglyzeriden oder Elektrolyten, wird gewonnenes Peptidmaterial im großen Maßstab aus 10 000 L HF zwei aufeinanderfolgenden chromatographischen Trennverfahren zugeführt. Um Bakterienwachstum und Proteolyse zu verhindern, wird das gewonnene Filtrat zunächst auf 4 °C abgekühlt und auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Beim ersten Trennverfahren handelt es sich um eine Kationenaustausch Chromatographie. Eine mit Probenmaterial versehene Kationenaustauschersäule wird zunächst mit 0,01 M HCl gewaschen. Zur Erstellung von 8 Eluaten werden schrittweise sieben Pufferlösungen ansteigenden pH-Wertes (pH 3,6–4,5–5,0–5,6–6,6–7,4–9,0) appliziert und das jeweilige Eluat aufgefangen. Der Durchlauf wird aufgefangen und daraus das 8. Eluat gebildet. Jedes Eluat wird im Anschluss dem zweiten Trennverfahren, einer *Reversed-Phase* Chromatographie (RPC), zugeführt. Dabei wird die unpolare, stationäre Phase mit den 8 Eluaten beladen. Als hydrophile, mobile Phase wird 0,01 M HCl mit einem Gradienten von 100 % zu 60 % eingesetzt und so jedes Eluat in 48 weitere Peptidfraktionen aufgetrennt.

Das Ergebnis dieses zweischrittigen Auftrennungsprozesses sind acht Eluatfraktionen aus der Kationenaustausch Chromatographie zu je 48 Peptidfraktionen aus der *Reversed-Phase* Chromatographie. Also insgesamt 384 Peptidfraktionen, die der AG Barth in lyophilisierter und entsalzter Form zur Verfügung gestellt wurden. Die zum Screening bereitgestellten Peptidbänke sind Aliquote aus dem im großen Maßstab (10 000 L HF) angelegten Herstellungsverfahren und entsprechen je nach bereitgestellter Charge entweder 2 oder 5 L HF-Äquivalenten. In anderen Worten: Eine Peptidfraktion aus einer Charge im 5 L HF-Äquivalent trägt Peptidmaterial isoliert aus 5 L Hämofiltrat. Dies entspricht der 2,5-fachen Peptidmenge, die eine Peptidfraktion im 2 L HF-Äquivalent beinhaltet. Erweist sich im Screening eine Peptidfraktion als Treffer, also mit hemmendem Effekt gegen das jeweilige bakterielle Toxin, so muss diese in weiteren rechromatographischen Auftrennungszyklen mittels erneuter *Reversed-Phase* Chromatographie subfraktioniert werden. Dies geschieht solange bis eine einzelne

Subfraktion bzw. Subsubfraktion nur noch so wenige unterschiedliche Peptide enthält, dass diese massenspektrometrisch mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) isoliert und identifiziert werden können.

### 1.6.2 Die Nomenklatur der Peptidbank

Um in der folgenden Arbeit eine einheitliche und verständliche Nomenklatur zu ermöglichen, soll jede Peptidfraktion sowohl nach der Herkunft ihrer Eluatfraktion (E) aus dem ersten Trennungsverfahren (Eluat 1–8) als auch mit ihrer Peptidfraktionsnummer (F) aus dem zweiten Trennungsverfahren (Fraktion 1–48) benannt werden. So trägt beispielsweise die Peptidfraktion 32, die in der *Reversed-Phase* Chromatographie aus dem Eluat 3 separiert wurde das Kürzel E3F32. Stellt sich die exemplarische Fraktion E3F32 als Treffer heraus, werden Subfraktionen (SF) aus der rechromatographischen Auftrennungen bezüglich ihrer Ausgangsfraktion folgendermaßen benannt: E3F32.SFx und weitere Subsubfraktionen (SSF) E3F32.SFx.SSFy etc.

### 1.6.3 Beispiele vorausgegangener Projekte mit der Peptidbank

Das Peptidbank-Projekt, das bislang wohl am meisten Aufsehen erregte, ist die Entdeckung des *Virus-inhibitory-peptide* (VIRIP). J. Münch et al. isolierten aus einer Peptidbank aus humanem Hämofiltrat ein Spaltprodukt des Proteaseinhibitors α1–Antitrypsin und zeigten, dass VIRIP die HIV-1 Infektion durch die direkte Interaktion mit dem Transmembranprotein gp41 hemmt. Sowohl in humanem Plasma als auch im Tiermodell konnten etwaige zytotoxische Effekte des generierten Peptids selbst in extrem hohen Applikationsdosierungen ausgeschlossen werden (Munch et al. 2007). Ein weiteres beispielhaftes Projekt ist die Entdeckung eines inhibitorischen Peptids aus humanem Hämofiltrat gegen Infektionen mit dem Zytomegalievirus (Borst et al. 2013). Auch in der eigenen Arbeitsgruppe konnten in Zellversuchen bereits inhibitorische Peptidfraktionen gegen die Vergiftung durch das DT oder das C2-Toxin identifiziert und in weiteren Auftrennungszyklen bestätigt werden (Hegenauer 2014; Fischer 2014).

Diese Beispiele demonstrieren die potenziellen Möglichkeiten, die aus dem Peptidbankscreening hervorgehen.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifizierung neuartiger peptiderger Hemmstoffe gegen die Toxine von *C. difficile,* dem Auslöser der pseudomembranösen Kolitis und anderen antibiotikaassoziierten, nosokomialen Durchfallerkrankungen, ist aus vielerlei Hinsicht ein erstrebenswertes Ziel. Das Auftreten neuer hypervirulenter *C. difficile* Stämme wie 027/NAP1 hat in den vergangenen Jahren nicht nur klinischen Einrichtungen große Probleme bereitet. Epidemieartige Ausbrüche, höhere Rezidivraten sowie die gesteigerte Mortalität sind charakteristisch für 027/NAP1 und lassen sich mitunter zurückführen auf eine zunehmende Antibiotikaresistenz, die Produktion größerer Toxinmengen, sowie die zusätzliche Expression additiver Virulenzfaktoren wie CDT (Ghose 2013; McDonald et al. 2005). Die orale Gabe der Antibiotika Metronidazol und Vancomycin ist der aktuelle therapeutische Goldstandard für die CDAD. Diese Therapie ist nach wie vor wirksam, richtet sich jedoch lediglich gegen die Bakterien und nicht gegen die krankheitsauslösenden Toxine, die zu Symptombeginn bereits in großen Mengen im Darm vorliegen. Spezifische pharmakologische Inhibitoren jener Toxine könnten daher eine sinnvolle Ergänzung zur bisherigen Therapie mit Antibiotika darstellen – insbesondere für akute und schwere CDI mit foudroyantem Krankheitsverlauf. Körpereigene Peptidinhibitoren, isoliert aus dem menschlichen Blut, könnten den zusätzlichen Vorteil bieten, dass bei der Applikation keine nennenswerten immunologischen Reaktionen oder sonstige entscheidende Nebenwirkungen zu erwarten sind (Guani-Guerra et al. 2010). Zum Teil alternativlos werden Arzneimittel auf der Basis körpereigener Peptide schon lange im klinischen Alltag eingesetzt und bilden oftmals eine unverzichtbare Säule in der Therapie vieler Erkrankungen. So sollen Insulinanaloga zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 oder rekombinant hergestellter Faktor VIII zur Behandlung der angeborenen Blutgerinnungsstörung Hämophilie A nur als zwei exemplarische Beispiele für eine zahllose Menge weiterer Medikamente dieser Art genannt werden (White et al. 1989; Mesa 2014).

Als Teil des angeborenen Immunsystems übernehmen körpereigene Peptide auch antimikrobielle Abwehrfunktionen. Defensine beispielsweise bilden eine heterogene Familie kationischer, Cystein-reicher Peptide, die vor allem von neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen produziert werden und mannigfaltige Abwehrfunktionen besitzen. So wirken sie einerseits als Chemokine aktivierend auf das Immunsystem, bilden netzförmige Strukturen aus, die bakterielle Pathogene einfangen, interagieren pathogenselektiv mit Cholesterin-armen Zellmembranen und zeigen außerdem direkte Aktivität gegen bakterielle Toxine (Zhou et al. 1998; Lehrer u. Lu 2012; Menendez u. Brett Finlay 2007; Goncalves et al. 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine bereitgestellte Peptidbank, hergestellt aus humanem Hämofiltrat, auf inhibitorische Peptidfraktionen gegen die pathogenen Toxine von *C. difficile* in zellbasierten Tests zu untersuchen. Mit identifizierten, hemmenden Peptidfraktionen, sollten auf dem Weg zur Isolation eines definierten Peptids mehrmalige rechromatographische Auftrennungszyklen durchlaufen und simultan zusätzliche Untersuchungen zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus des Hemmeffekts realisiert werden. Da in der AG Barth in vorausgegangenen Peptidprojekten bereits hemmende Peptidfraktionen gegen das DT (Fischer 2014) und verschiedene binäre ADP-ribosylierende Toxine (Hegenauer 2014) identifiziert werden konnten, war ein zielführendes Screeningverfahren bereits etabliert. Insbesondere die Kenntnis über die hohe funktionelle und strukturelle Homologie innerhalb der Familie der binären ADP-ribosylierenden Toxine, machte CDT interessant für vergleichende und aufbauende Experimente, die direkt an die beiden Vorläuferprojekte anknüpfen sollten.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte und wiederverwendbare Materialien

In Tabelle 1 sind alle Geräte und wiederverwendbaren Materialen aufgeführt.

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Geräte und wiederverwendbarer Materialien.

| Gerät | Hersteller, Standort (deutscher Standort, falls vorhanden) |
|---|---|
| Brutschrank C150 | Binder, Tuttlingen |
| Electrophoresis Power Supply EPS 601 | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Glasplatten 20 x 10 cm (mit und ohne Ausschnitt) | PEQLAB Biotechnologie Gmbh, Erlangen |
| Magnetrührer RET basic C | IKA, Staufen |
| Mikroskop Axiovert 40 CFL | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop-Kamera Prog-Res C10 plus | Jenoptik, Jena |
| Neubauer Zählkammer | LO-Laboroptik, Lancing (UK) |
| pH-Meter inoLab® pH 720 | WTW, Weilheim |
| Pipetten: PIPETMAN®<br>Reference® | Gilson International B.V., Limburg-Offheim<br>Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe PIPETBOY | INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald |
| Plattformschüttler Duomax 1030 | Heidolph, Schwabach |
| Plattformschüttler Unimax 2010 | Heidolph, Schwabach |
| Präzisionswaage Kern EG | KERN & SOHN GmbH, Balingen |
| REAX Top Vortexer | Heidolph, Schwabach |

| | |
|---|---|
| Scanner Epson Perfection 2480 PHOTO | EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch |
| Semi-Dry Elektroblotter PerfectBlue™ | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Sicherheitswerkbank HERAsafe™ HS 12 | Heraeus Holding GmbH, Hanau |
| Spectrophotometer DU 640 | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Vakuumpumpsystem | KNF Neuberger GmbH, Freiburg |
| Vertikale Doppelgel-Elektrophoresekammer | PEQLAB Biotechnologie Gmbh, Erlangen |
| Zentrifugen: Centrifuge 5415D | Eppendorf, Hamburg |
| Centrifuge 5417R (gekühlt) | Eppendorf, Hamburg |
| Micro Centrifuge | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Megafuge 1.0 | Heraeus, Hanau |

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind verwendete Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

**Tabelle 2:** Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien

| **Material** | **Hersteller, Standort (deutscher Standort, falls vorhanden)** |
|---|---|
| Blotting-Papier | Macherey & Nagel, Düren |
| Deckgläser | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Objektträger | Menzel Gläser, Braunschweig |
| Parafilm® M | Bemis Company, Inc., Oshkosh (USA) |
| Pasteur-Pipetten (Glas) | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen, diverse | Sarstedt, Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße, diverse | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|---|---|
| Röntgenfilme Contatyp CX–BL + | Typon Röntgen-Film GmbH, Frankenthal |
| Spritze BD Plastipak™, 1 mL | BD, Heidelberg |
| Sterican® Einmalkanülen, Gr. 18, G 26 x 1“ | B. Braun, Melsungen |
| UV-Küvette | Sarstedt, Nümbrecht |
| Whatman® Protran® BA85 Nitrozellulosemembran | GE Healthcare Life Sciences, Freiburg |
| Zellkultur Testplatten (12, 24, 48, 96 Well) | TPP, Trasadingen (Schweiz) |
| Zellkulturschalen 100 | TPP, Trasadingen (Schweiz) |
| Zellschaber | Sarstedt, Nümbrecht |

### 2.1.3 Chemikalien

In Tabelle 3 sind verwendete Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Chemikalien

| **Chemikalie** | **Bezugsquelle, Standort (deutscher Standort, falls vorhanden)** |
|---|---|
| 6-Biotin-17-NAD | R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt |
| Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Argininmonohydrochlorid | AppliChem, Darmstadt |
| Bromphenolblau-Na-Salz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail | Roche, Mannheim |
| Coomassie® Brilliant Blue G250, R250 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Eisessig | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

| | |
|---|---|
| Ethanol | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Gibco® Fötales Kälberserum (FCS) | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Glycerin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Glycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Salzsäure (HCL) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Isopropanol | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat ($KH_2PO_4$) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Luminol | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Methanol | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH2PO4) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck KGaA, Darmstadt |
| p-Coumarsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ponceau S | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) | Roche, Mannheim |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Trishydroxylmethylaminomethan (Tris) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Tris-HCl | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Essigsäure 100 % | AppliChem GmbH, Darmstadt |

| | |
|---|---|
| Aktivkohle | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin | Roche, Mannheim |
| Trypsininhibitor | Roche, Mannheim |
| Tween® 20 | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) 30 % | J.T. Baker, Griesheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem, Darmstadt |
| Entwickler RTU 60 | Adefo, Dietzenbach |
| Fixierer RTU 60 | Adefo, Dietzenbach, Deutschland |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| PageRuler™ Unstained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Natriumpyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| Nicht-essentielle Aminosäuren | Gibco, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin 1000 mg/mL | Gibco, Karlsruhe |
| Minimum Essential Medium (MEM) | Gibco, Karlsruhe |
| L-Glutamin | Gibco, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ortho-Phosphorsäure 85 % ($H_3PO_4$) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| 0,25 % Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

### 2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Die zellbasierten Versuche wurden toxinabhängig mit den in Tabelle 4 aufgeführten epithelialen Zellreihen durchgeführt. Vero-Zellen tragen Rezeptoren für alle in dieser Arbeit verwendeten Toxine. HeLa-Zellen hingegen zeigen keine Affinität für

das CDT-Toxin von *C. difficile* und wurden in der vorliegenden Arbeit nur für Versuche mit Toxin A und dem C2-Toxin eingesetzt.

**Tabelle 4:** Auflistung verwendeter eukaryotische Zelllinien

| Zelllinie | ATCC®-Nummer | Spezies |
|---|---|---|
| HeLa | CCL-2 | Mensch |
| Vero | CCL-81 | Grüne Meerkatze |

### 2.1.5 Medien und Zusätze zur Arbeit mit Zellkulturen

Die Versuche beider Zellreihen wurden mit MEM durchgeführt. Zur Zellkultivierung wurde dem Medium 10 % FCS, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren und 10 mg/mL Penicillin / Streptomycin zugefügt.

### 2.1.6 Häufig verwendete Puffer

In Tabelle 5 sind häufig verwendete Puffer aufgeführt.

**Tabelle 5:** Auflistung häufig verwendeter Puffer. In Klammer ist die Konzentration in Lösung angegeben.

| Puffer | Zusammensetzung |
|---|---|
| 10 x SDS-Laufgelpuffer | 66 g Tris (1,19 mM)<br>288 g Glycin (439,6 mM)<br>ad 2 L $H_20$ |
| 1 x SDS-Laufgelpuffer | 500 mL 10 x SDS-Laufgelpuffer<br>5 g SDS (0,1 %)<br>ad 5 L $H_20$ |
| 5 x Lämmli Probenpuffer | 15,6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8) (312,5 mM)<br>5 g SDS (10 %)<br>25 mL Glycerin (50 %) |

| | |
|---|---|
| | 7,5 mg Bromphenolblau (0,015 %)<br>5 mL DTT (10 %)<br>ad 50 mL $H_2O$ |
| ADP-Ribosylierungspuffer | 4 mL Tris-HCl (pH 7,5) (20 mM)<br>58,4 mg EDTA (1 mM)<br>200 µL DTT (1 mM)<br>1 mL $MgCl_2$ (5 mM)<br>ad 200ml $H_2O$<br>vor Gebrauch: 1 x cOmplete™ |
| Bradford-Reagenz | 10 mg Coomassie® Brilliant Blue G250 (0,117 mM)<br>5 mL Ethanol (5 %)<br>10 mL ortho-Phosphorsäure (85 %)<br>ad 100 mL $H_2O$ |
| Coomassie-Entfärbelösung | 450 mL Methanol (45 %)<br>100 mL Eisessig (10 %)<br>ad 1 L $H_2O$ |
| Coomassie-Färbelösung | 2,5 g Coomassie® Brilliant Blue R250 (100 mM)<br>450 mL Methanol (45 %)<br>100 mL Eisessig (10 %)<br>ad 1 L H2O |
| Chemilumineszenz (ECL), Lösung A | 500 µL 1 M Tris-HCl (pH 9,0) (100 mM)<br>50 µL 250 mM Luminol (2,5 mM)<br>22 µL 90 mM Coumarsäure (0,396 mM)<br>ad 5 mL $H_2O$ |
| Chemilumineszenz (ECL), Lösung B | 500 µL 1 M Tris-HCl (pH 9,0) (100 mM) |

| | |
|---|---|
| | 50 µL 30 % $H_2O_2$ (0,3 %)<br>ad 5 mL $H_2O$ |
| Phosphat Buffered Saline (1 x PBS) | 8,0 g NaCl (137 mM)<br>0,2 g KCl (2.7 mM)<br>1,44 g $NaH_2PO_4$ (8 mM)<br>0,24 g $KH_2PO_4$ (1.8 mM)<br>ad 1 L $H_2O$<br>mit HCl auf pH 7,4 einstellen |
| Phosphat Buffered Saline + Tween (1 x PBS-T) | 1 L 1 x PBS<br>10 mL Tween® 20 (0,1 %)<br>ad 10 L $H_2O$<br>mit HCl auf pH 7,4 einstellen |
| Ponceau S-Färbelösung | 2 g Ponceau S (2,63 mM)<br>50 mL Essigsäure (5 %)<br>ad 1 L $H_2O$ |
| Sammelgelpuffer | 60,6 Tris-HCl (pH 6,8) (0,5 M)<br>ad 1 L $H_2O$ |
| Towbin-Puffer | 200 mL 10 x SDS-Laufgelpuffer<br>400 mL Methanol (20 %)<br>ad 2 L $H_2O$ |
| Trenngelpuffer | 181,8 g Tris-HCl (pH 8,8) (1,5 M)<br>ad 1 L $H_2O$ |

### 2.1.7 Verwendete bakterielle Toxine

Die in der Arbeit verwendeten Toxine werden in Tabelle 6 näher beschrieben.

**Tabelle 6:** Auflistung verwendeter bakterieller Toxine

| Toxin | Ursprung | Bezugsquelle / Herstellung |
|---|---|---|
| Toxin A<br><br>CDTa, CDTb | *C. difficile* | Aufreinigung und Bereitstellung durch Prof. Aktories, Universität Freiburg. |
| C2I, C2IIa | *C. botulinum* | Expression, Aufreinigung und Aktivierung in der AG Barth mit rekombinanten E. coli BL21 über das GST-System. |

### 2.1.8 Verwendete Software

In Tabelle 7 ist die in dieser Arbeit verwendete Computersoftware aufgeführt.

**Tabelle 7**: Auflistung verwendeter Computersoftware

| Medium | Bezugsquelle, Standort (deutscher Standort, falls vorhanden) |
|---|---|
| AxioVision Re. 4.7 | Zeiss, Göttingen |
| GraphPad Prism 5 | Statcon, Witzenhausen |
| ImageJ 1.4.3.67 | National Institutes of Health, Bethesda (USA) |
| Microsoft® Office 2016 | Microsoft Corp., Washington (USA) |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Umgang mit der Peptidbank

Wie in Abschnitt 1.6 beschrieben, wurde von Herrn Dr. Ludger Ständker (U-PEP) eine Peptidbank in zwei Chargen zu jeweils zwei Aliquotsätzen bereitgestellt. Charge 040823 lag im 5 L HF-Äquivalent, Charge 050905 im 2 L HF-Äquivalent vor.

Die Lagerung der Peptidbank erfolgte bei -20 °C. Vor Versuchsbeginn wurden die jeweiligen Fraktionen aus ihrer lyophilisierten Form mit jeweils 200 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht und resuspendiert. Für das Peptidscreening auf 96-*Well* Mikrotiterplatten mit einem Probevolumen von 100 µL pro *Well* wurden 10 µL Peptidlösung verwendet. Für spätere Versuche einzelner rechromatographisch aufgetrennter Fraktionen oder zur genaueren Untersuchung eines Hemmeffekts wurden die Konzentrationen teilweise verändert, worauf an jeweiliger Stelle hingewiesen wird.

Da die Chargen schon zu Beginn zu unterschiedlichen HF-Äquivalenten vorlagen und weitere rechromatographische Auftrennungszyklen meist im höheren Maßstab erfolgten, erschien es sinnvoll einen Index zur besseren Vergleichbarkeit des verwendeten Peptidmaterials einzuführen. Die Peptid-Äquivalentkonzentration c(P) wird in $\frac{L\,HF}{\mu L}$ angegeben und bezeichnet den Quotienten aus HF-Äquivalent in Litern pro µL $H_2O$ *bidest* in Lösung. Beispielhaft errechnet sich der c(P) der Charge 040823 wie folgt: c(P)= $\frac{5\,L\,HF}{200\,\mu L}$ = 0,025 $\frac{L\,HF}{\mu L}$. Da standardmäßig 10 µL Peptidlösung auf 100 µL Füllungsvolumen eines *Wells* eingesetzt werden, ergibt sich eine Peptidkonzentration im *Well* mit c(W)= $\frac{c(P)}{10}$ $[\frac{\frac{L\,HF}{yL}}{yL}]$.

### 2.2.2 Zellkultivierung

Sowohl HeLa-, als auch Vero-Zellen sind adhärent und konfluierend wachsende epitheliale Zellen. Die im Folgenden beschriebenen Schritte sind für beide Zelltypen gültig. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % $CO_2$ in Schalen mit 10 cm Durchmesser zusammen mit dem in Abschnitt 2.1.5 beschriebenen Medium. Die Passagierung erfolgte je nach Konfluenz nach zwei bis drei Tagen indem das Medium abgesaugt und die Schale mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen wurde. Zur Ablösung der adhärenten Zellen vom Schalenboden erfolgte eine etwa zweiminütige Inkubation mit 2 mL Trypsin unter leichten Schüttel- und Klopfbewegungen. Durch Zugabe von 8 mL erwärmtem, FCS-haltigem Medium wurde Trypsin inaktiviert. Die Zellernte wurde etwa zehnmal resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß übertragen. Es erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration

mittels einer Neubauer Zählkammer. Für Versuche am Folgetag wurden ca. 1 x $10^6$ Zellen, für Versuche am übernächsten Tag ca. 5 x $10^5$ Zellen in 12,5 mL Medium auf 96-*Well* Mikrotiterplatten ausgesät. Vom Überstand wurde eine neue Erhaltungskultur angelegt. Für die Verwendung anderer Mikrotiterplatten wurden die in Tabelle 8 beschriebenen Volumina verwendet.

**Tabelle 8:** Auflistung der jeweiligen Füllungsvolumina unterschiedlicher Mikrotiterplatten.

| Mikrotiterplatte | Volumen pro *Well* | Gesamtvolumen |
|---|---|---|
| 6-*Well* | 2 mL | 12,5 mL |
| 12-*Well* | 1 mL | |
| 24-*Well* | 0,5 mL | |
| 48-*Well* | 0,25 mL | |
| 96-*Well* | 0,1 mL | |

### 2.2.3 Zellvergiftungsversuche

Zur Identifizierung möglicher inhibitorischer Peptideffekte wurden Zellen nach oben beschriebener Kultivierung in 96-*Well* Mikrotiterplatten in An- und Abwesenheit von Peptidmaterial zusammen mit den bakteriellen Toxinen inkubiert. Hierzu wurde zunächst das serumhaltige Medium abgesaugt und die einzelnen Zellkammern mit vorgewärmtem PBS gewaschen. 10 µL Peptidlösung wurden zeitgleich mit dem zuvor angelegten Toxinansatz in zusatzfreiem Medium auf ein Zielvolumen von 100 µL pro Zellkammer zugeführt. Es wurden stets drei Positiv-Kontrollen mit Toxin ohne Peptidmaterial, sowie drei Negativ-Kontrollen, welche nur mit Medium ohne weitere Zusätze inkubiert wurden, angelegt. Die Inkubation nach Vergiftung erfolgte bei 37 °C und 5 % $CO_2$ im Brutschrank und wurde nur kurzfristig zur Dokumentation unterbrochen.

Jedes Toxin zeigt konzentrationsabhängig im zeitlichen Verlauf einen typischen zytopathogenen Effekt, welcher sich anhand morphologischer Kriterien lichtmikroskopisch verfolgen lässt, und im stündlichen Abstand nach

Vergiftungsbeginn photographisch mit Hilfe der Mikroskop-Kamera dokumentiert wurde. Alle in dieser Arbeit verwendeten Toxine und Zellreihen zeigen lichtmikroskopisch vergleichbare Vergiftungsabläufe. Hierbei kommt es nach wenigen Stunden zur charakteristischen Zellabrundung und konsekutiver Apoptose. Die Quantifizierung erfolgte durch Auszählung des Quotienten von abgerundeten Zellen und nicht-abgerundeten Zellen innerhalb eines mikroskopischen Bildausschnitts in 20 x Vergrößerung mit Hilfe der Software ImageJ. Die anschließende statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde mit der Software GraphPad Prism durchgeführt. Abbildung 7 zeigt anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen exemplarisch die zellmorphologische Veränderung einer Vergiftung von Vero-Zellen mit CDT im zeitlichen Verlauf.

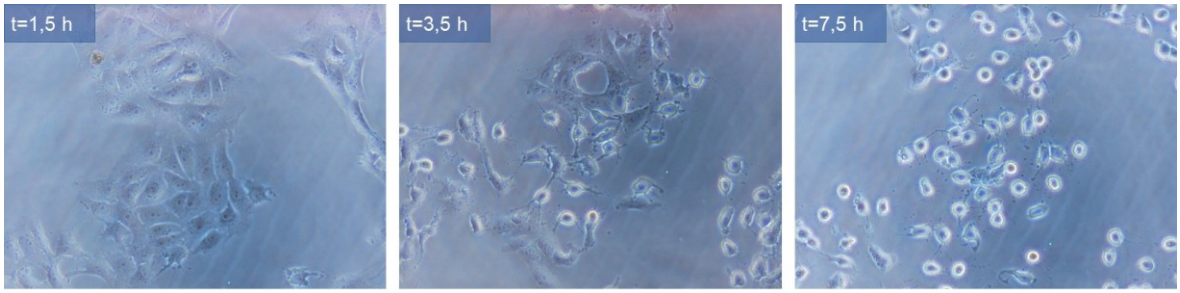



**Abb. 7: Exemplarische Darstellung einer Zellvergiftung im zeitlichen Verlauf.**

Abgebildet sind drei Momentaufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Zellvergiftung. Es handelt sich um repräsentative Bildausschnitte der Aufnahme mit der Mikroskop-Kamera bei 20 x Vergrößerung. Die Bilder zeigen die Vergiftung von Vero-Zellen mit CDTa/CDTb in 35/70 ng/mL. Abgebildet sind die Zeitwerte t=1,5 h, 3,5 h und 7,5 h.

Zunächst erfolgte das Primärscreening der Peptidbank mit einem Toxin. Dabei wurde jede Peptidfraktion zunächst nur in einer einzelnen Zellkammer untersucht. Zeigte sich hierbei eine auffällige Peptidfraktion mit möglichem Hemmeffekt, so wurde diese in weiteren Zellvergiftungsversuchen durch Mehrfachbestimmungen überprüft. Bestätigte sich der Hemmeffekt wurde die jeweilige Peptidfraktion von Herrn Dr. Ludger Ständker im beschriebenen Verfahren rechromatographisch erneut fraktioniert und das beschriebene Prozedere wiederholt.

### 2.2.4 Herstellung von Zelllysat und Proteinkonzentrationsbestimmung

Um *in vitro* Versuche auf molekularer Ebene mit Methoden wie der SDS-Gelelektrophorese und dem Western-Blot durchführen zu können, müssen die Zellen aufgeschlossen und die Proteine des Zytosols extrahiert werden. Zeigte die Zellschale konfluentes Wachstum, wurde das Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Der ADP-Ribosylierungspuffer wurde zur Verhinderung der Autolyse proteinhaltigen Zellmaterials mit einem Protease-Inhibitor-Gemisch (cOmplete™) im Verhältnis 50:1 versetzt und in die Zellschale gegeben. Nach Ablösung der Zellen mittels Zellschaber erfolgte die mechanische Lyse der Suspension mit Hilfe einer Spritze und Einmal-Injektions-Kanüle (26 G) durch etwa 15-malige Resuspension. Nach Abzentrifugation größerer Zellbestandteile mittels einer Kühlzentrifuge für 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm wurde die proteinhaltige, flüssige Phase entnommen und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach Bradford. Das verwendete Bradford-Reagenz zeichnet sich dadurch aus, dass der Inhaltsstoff Coomassie® Brilliant Blue G250 mit Proteinen Komplexe bildet, was sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 590 nm verschiebt. Nach Kalibrierung des Photometers und Erstellung einer Eichgeraden mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen kann so die Proteinkonzentration einer Probe ermittelt werden. Hierzu wurden zwei UV-Küvetten mit 2 µL des Zelllysats, 200 µL Bradford-Reagenz und 798 µL $H_2O$ *bidest* befüllt. Eine dritte Küvette als Eichkontrolle wurde an Stelle des Zelllysats mit 2 µL des ADP-Ribosylierungspuffers befüllt.

### 2.2.5 Untersuchung der *in vitro* Enzymaktivität

Die folgenden Methoden dienen der Identifizierung und Charakterisierung eines Hemmeffekts auf molekularer Ebene, nachdem dieser in Zellvergiftungsversuchen festgestellt wurde. Dabei sollte die Wirkung des Toxins auf die zuvor aufgeschlossenen Zytosolbestandteile in An- und Abwesenheit des Peptidmaterials untersucht werden. Die Verabreichung der enzymatisch aktiven Komponente des binären Toxins CDTa zusammen mit dem Biotin-markierten Cosubstrat $NAD^+$ zum Zelllysat bewirkt die enzymatische Übertragung einer biotinylierten ADP-Ribose an

zuvor aufgeschlossene G-Aktin-Moleküle. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass Biotin, dank der hohen Bindungsaffinität zu Streptavidin, nachfolgend mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot einfach detektiert und semiquantitativ analysiert werden kann.

Es wurden verschiedene Ansätze (Positiv-Kontrolle, Negativ-Kontrolle, Peptidprobe) zu je 25 µL jeweils mit 1 µL Biotin-$NAD^+$, 40 µg Zelllysat und ADP-Ribosylierungspuffer mit Protease-Inhibitor Gemisch (cOmplete™) ad 25 µL vorbereitet. Für die Peptidproben wurden zunächst 2,5 µL Peptidlösung zusammen mit dem CDTa-Toxinansatz für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Vergiftungsreaktion gestartet, indem Toxin zur Positiv-Kontrolle bzw. Toxin-Peptid-Ansatz zur Peptidprobe hinzugegeben wurde. Es erfolgte die Inkubation der Ansätze bei 37 °C für 5–15 min. Zum Beenden der enzymatischen Toxinaktivität wurde 6,25 µL 5 x Lämmli-Probenpuffer mit DTT zur Spaltung der Disulfidbrücken hinzugegeben und die Proben für 10 min bei 95°C abgekocht. Inkubation und Abkochen erfolgten mittels Thermomixer Comfort.

### 2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Durch Anlage eines elektrischen Feldes kommt es zur Proteinwanderung durch ein Polyacrylamid-Gel. Natriumdodecylsulfat (SDS) fungiert als Detergenz und verleiht den Proteinen eine negative Ladung. Die benötigten Polyacrylamid-Gele wurden nach dem in Tabelle 9 beschriebenen Pipettierschema selbst hergestellt und bestehen aus einem kleineren Sammelgel-Anteil sowie einem Laufgel-Anteil. Zunächst wurde das Laufgel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach der Auspolymerisierung wurde das Sammelgel eingegossen und für die spätere Beladung mit Proben mit Hilfe eines Kamms Taschen geformt.

**Tabelle 9:** Pipettierschema für die Herstellung von Polyacrylamid-Gelen zur SDS-PAGE.

| | **Laufgel (12,5 %)** | **Sammelgel (6 %)** |
|---|---|---|
| $H_2O$ [mL] | 8 | 8 |

| | | |
|---|---|---|
| SDS-Laufgelpuffer [mL] | 6,2 | - |
| SDS-Sammelgelpuffer [mL] | - | 3,8 |
| 10 % SDS [µL] | 273 | 150 |
| 30 % Acrylamid/Bis-Lösung [mL] | 10,4 | 3 |
| 10 % APS [µL] | 248 | 150 |
| TEMED [µL] | 25 | 17 |

Neben den Proben wurde eine Tasche mit einem Marker (*Prestained Protein Ladder*) befüllt, um bei der anschließenden Bandendetektion die Molekülgrößen abschätzen zu können. Die Elektrophorese wurde für etwa eine Stunde bei 300 V, 37 mA und 100 W durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung auf einem Plattformschüttler bei RT für etwa 30 min gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung soweit entfärbt, bis sich die Banden klar vom Gel absetzten.

### 2.2.7 Western-Blot

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der zytosolischen Proteine in der SDS-PAGE, dient der Western-Blot der spezifischen Detektion einzelner Eiweißverbindungen. Im *Semi-Dry* Blotverfahren wurde die zuvor in der SDS-PAGE erstellte Gelmembran auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurden zunächst sechs Blotting-Papiere, sowie die Nitrozellulosemembran auf Größe der Gelmembran zugeschnitten und in Towbin-Puffer kurz eingelegt. Auf den *Semi-Dry* Elektroblotter wurden nun, zwischen jeweils drei Blotting-Papiere von oben und unten, Gelmembran und Nitrozellulosemembran deckungsgleich übereinander platziert. Die Gelmembran kam hierbei auf der Seite der Kathode, die Nitrozellulosemembran zur Anode gewandt zu liegen. Zur Übertragung der Proteine von der Gelmembran auf die Nitrozellulosemembran wurde senkrecht zur Gelmembran ein elektrisches Feld mit 1,5 mA pro $cm^2$ Membranfläche für eine Stunde angelegt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Übertragung wurde die

Nitrozellulosemembran im Anschluss mit Ponceau S-Färbelösung für 10-20 min bei RT auf einem Plattformschüttler gefärbt und nach Dokumentation mit Wasser entfärbt. Um eine unspezifische Proteinbindung zu verhindern folgte die einstündige Inkubation der Nitrozellulosemembran in Milchpulverlösung (5 % Milchpulver in PBS-T) bei RT und anschließendem Waschen in PBS-T. Aufgrund der hohen Affinität für Streptavidin lassen sich Biotin-markierte Moleküle über eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase (Strep-POD) durch Zugabe einer Luminol-haltigen Chemilumineszenz (ECL) nachweisen. Die Peroxidase katalysiert hierbei die $H_2O_2$-abhängige Umsetzung des Luminol, was die Detektion der Signalbanden auf dem Röntgenfilm ermöglicht. Strep-POD wurde hierfür mit PBS-T im Verhältnis 1:2500 angesetzt und die Membran darin für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in PBS-T. In der Dunkelkammer erfolgte die Behandlung mit ECL und die Detektion der Signalbanden mit Hilfe von Röntgenfilmen und entsprechenden Lösungen zum Entwickeln und Fixieren.

### 2.2.8 Toxin-Translokationsversuche

Der Toxin-Translokationsversuch stellt, wie die Versuche zur Bestimmung der *in vitro*-Enzymaktivität, eine praktische Möglichkeit zur Charakterisierung eines zuvor festgestellten Hemmeffekts dar. Es wird sich die genaue Kenntnis der Toxinprozessierung bis zur Einschleusung der enzymatisch aktiven Toxinkomponente in das Zytosol zu Nutze gemacht. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, wird durch die spezifische Blockade der endosomalen v-ATPase mit Bafilomycin A1 die Toxinaufnahme über diesen Weg verhindert und eine artifizielle Translokation des Toxins über die Zellmembran direkt in das Zytosol durch Ansäuern (pH ≤ 5,2) des extrazellulären Mediums ermöglicht. In Abhängigkeit des Zeitpunktes, zu welchem die hemmende Peptidlösung zugegeben wird, können verschiedene Szenarien überprüft und der Hemmmechanismus auf diese Weise genauer eingegrenzt werden.

In einer 24-*Well* Mikrotiterplatte wurden Zellen über zwei Tage bei 37 °C und 5 % $CO_2$ kultiviert, sodass die Kammern subkonfluent bewachsen waren. Nährmedium ohne Zusätze wurde mit HCl und NaOH bei RT auf pH 4,5 exakt titriert. Zur

Verhinderung der Vergiftung durch die konventionelle, endosomale Toxinprozessierung, wurde jede Zellkammer mit 0,5 µL 1 µM Bafilomycin A1 in 250 µL zusatzfreiem Medium für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt, um Zellaktivitäten zu stoppen. Für das weitere Prozedere wurden zwei unterschiedliche Ansätze durchgeführt. Ansatz 1 erhielt simultan mit dem Toxin 25 µL Peptidlösung, während Ansatz 2 zunächst nur mit Toxin versetzt wurde. Während einer weiteren zehnminütigen Inkubation auf Eis sollte es unter Blockade der endosomalen Aufnahme zur Rezeptorbindung der Toxinmoleküle kommen. Nun wurde das Medium inklusive darin enthaltenem Toxin und Peptid abgesaugt und 250 µL vorgewärmtes, saures Medium (pH 4,5) zu den Zellkammern gegeben. Ansatz 2 erhielt zeitgleich 25 µL Peptidlösung zusammen mit dem sauren Medium. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten. Schließlich wurde das Medium abgesaugt und durch Bafilomycin A1-haltiges, pH-neutrales Medium mit Zusätzen ersetzt. Der Vergiftungsverlauf wurde lichtmikroskopisch dokumentiert und konnte so qualitativ beurteilt werden. Um eine Interpretation der Resultate zu ermöglichen, wurden unterschiedliche Kontrollen mituntersucht. Eine Positiv-Kontrolle mit Toxin erhielt wie die beiden Ansätze 1 & 2 saures Medium und diente der Überprüfung der erfolgreichen artifiziellen Toxintranslokation. Eine Negativ-Kontrolle ohne Toxin erhielt ebenfalls saures Medium und sollte pH-induzierte Veränderungen der Zellmorphologie ausschließen. Ein zusätzliches Negativ-Kontrollpaar (eine Negativ-Kontrolle mit und eine ohne Toxin) erhielt beim Mediumwechsel pH-neutrales Medium an Stelle des sauren Mediums, um eine unbeabsichtigte Vergiftung aufgrund insuffizienter Blockade der konventionellen, endosomalen Toxinprozessierung auszuschließen.

Mit Hilfe der Übersicht in Abbildung 8 können mögliche Szenarien eines Hemmeffektes im Toxin-Translokationsversuch interpretiert werden. Ein Hemmeffekt, vermittelt durch Interaktion mit dem Toxin (I), dem Rezeptor oder Hemmung der Porenbildung (II), wäre nur in Ansatz 1 zu erwarten, während Ansatz 2 isoliert den Translokationsprozess (V) und die intrazelluläre, enzymatische Toxinaktivität (VI) untersucht. Eine Differenzierung der beiden letztgenannten Optionen wäre mit Hilfe der gezielten Untersuchung der toxintypischen Enzymaktivität durch *in vitro* Vergiftungsversuche möglich. Sowohl die Endozytose

(III) als auch das endosomale Ansäuern (IV) werden beim Translokationsversuch ausgespart. Ein Hemmeffekt vermittelt über einen dieser beiden Schritte wäre im beschriebenen Setting also nicht reproduzierbar.

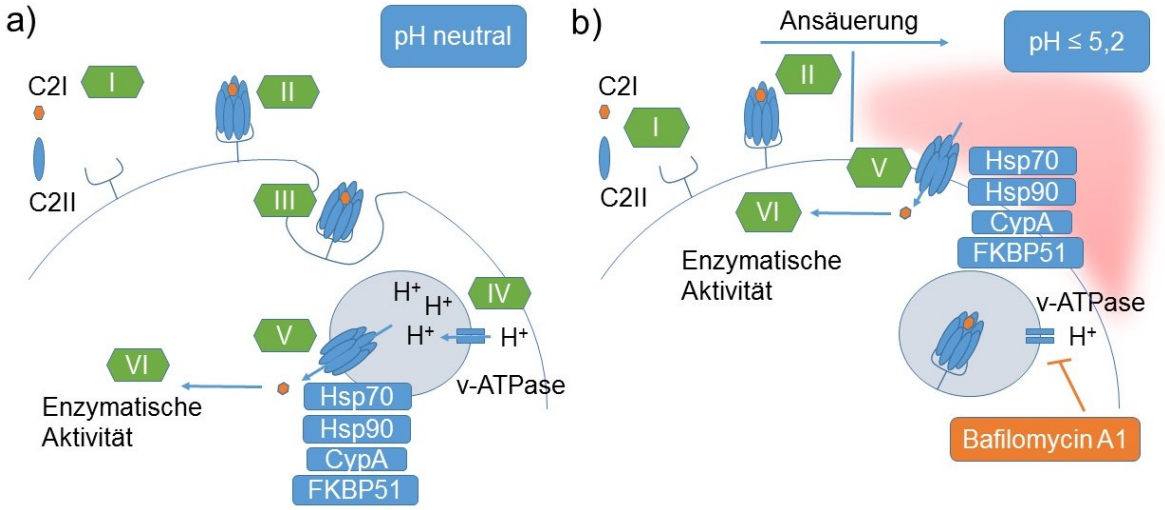



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Translokationsversuchs am Beispiel des C2-Toxins.**

Der linke Abbildungsabschnitt a) zeigt den gewöhnlichen Vergiftungsmechanismus. Der artifizielle Translokationsprozess über die Zellmembran ist im rechten Abschnitt b) dargestellt. Grüne Felder mit römischer Nummerierung kennzeichnen mögliche Ansatzpunkte des Hemmmechanismus: I) direkte Toxininteraktion, II) Rezeptorinteraktion und Porenbildung, III) Endozytose, IV) endosomales Ansäuern, V) Translokationsprozess, VI) Enzymaktivität. Eine detaillierte Beschreibung der Toxinprozessierung wurde in Abschnitt 1.5 gegeben.

### 2.2.9 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und statistische Auswertung

Alle Versuche, das Primärscreening ausgenommen, wurden unabhängig voneinander mindestens zweimal durchgeführt. Ausnahmen wurden explizit vermerkt und begründet. Zellvergiftungsversuche erfolgten im Primärscreening in Einzelwerten (n=1) und wurden durch Bestätigungsversuche in Mehrfachbestimmung (n≥3) überprüft. Die graphische Darstellung und die Berechnung der Mittelwerte ± Standardabweichung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.

# 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Chargen der bereitgestellten Peptidbank auf inhibitorische Peptide gegen die beiden Toxine A und *Clostridium difficile* Transferase (CDT) von *C. difficile* untersucht. In Zellvergiftungsversuchen erfolgte zunächst ein Primärscreening der Peptidbank in Einzelwerten. Dabei erkannte Peptidfraktionen mit möglichem inhibitorischem Effekt wurden durch Mehrfachbestimmung überprüft und nach Bestätigung in weiteren rechromatographischen Auftrennungszyklen weiterverfolgt. Parallel hierzu erfolgte bei Peptidfraktionen mit bestätigter inhibitorischer Wirkung die Charakterisierung des Hemmmechanismus mit Hilfe der vorangehend beschriebenen Methoden.

## 3.1 Identifizierung und Charakterisierung inhibitorischer Peptide gegen Toxin A

### 3.1.1 Primärscreening der Peptidbank (Charge 050905) zur Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen Toxin A

Zum ersten Screening der Peptidbank auf hemmende Peptidfraktionen gegen Toxin A wurden Zellvergiftungsversuche gemäß den Abschnitten 2.2.1-2.2.3 durchgeführt. Jede Peptidfraktion wurde zunächst als Einzelwert in je einer Zellkammer einer 96-*Well* Mikrotiterplatte auf HeLa-Zellen untersucht. Das Screening erfolgte mit der Peptidbank der Charge 050905, welche im 2 L HF-Äquivalent vorlag. Die Peptidfraktionen wurden mit 200 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht. Jede Zellkammer wurde mit 10 µL Peptidlösung behandelt. Dies entspricht einer Äquivalentkonzentration von c(P)=0,01 $\frac{L\,HF}{\mu L}$ und einer Peptidkonzentration im *Well* von c(W)=0,001 $\frac{\frac{L\,HF}{yL}}{yL}$. Nach Probevergiftungen zur Toxizitätsbestimmung von Toxin A wurde für alle Versuchsreihen des Primärscreenings eine Toxinkonzentration von 40 ng/mL gewählt.

Zu Beginn der Arbeit mit der Peptidbank traten noch unterschiedliche methodische Probleme auf. Einige Peptidfraktionen konnten so nicht einwandfrei ausgewertet werden. Die Problemfälle sind nachfolgend im Einzelnen aufgeführt. Über einen möglichen Hemmeffekt unter diesen Peptidfraktionen kann keine Aussage getroffen werden. Quantitative Versuchsauswertungen erfolgten lediglich bei jenen Peptidfraktionen, welche im qualitativen, lichtmikroskopischen Eindruck einen sichtbaren Unterschied zu den Positiv-Kontrollen oder im gegenseitigen Vergleich aufwiesen. Die Resultate aus dem Primärscreening mit Toxin A sind im Folgenden aufgeführt. Die zugehörigen quantitativen Auswertungen sind in Abbilung 9 dargestellt.

Beim Primärscreening von Eluat 1 traten methodische Probleme auf, die eine Auswertung der Positiv- und Negativ-Kontrollen verhinderten. Lediglich die Fraktionen E1F9 bis E1F32 konnten ausgewertet und untereinander verglichen werden. Eine verzögerte Vergiftungskinetik wurde dabei unter Inkubation mit den Peptidfraktionen E1F9, E1F16, E1F25 und E1F30 beobachtet.

In der zum Primärscreening vorliegenden Charge war Eluat 2 unvollständig. Sechs Peptidfraktionen (E2F2, E2F5, E2F29, E2F30, E2F39 und E2F40) fehlten in der Peptidbank. Beim Screening traten methodische Probleme bei E2F6, E2F7 und E2F16 bis E2F22 auf. Ein möglicher Hemmeffekt wurde bei E2F6, E2F17 und E2F21 beobachtet und muss unter Berücksichtigung der unsauberen Methodik kritisch überprüft werden.

In Eluat 4 der Peptidbank fehlten ebenfalls sechs Peptidfraktionen (E4F2, E4F5, E4F32, E4F33, E4F39 und E4F40). Ein möglicher Hemmeffekt wurde bei den Peptidfraktionen E4F24 und E4F45 beobachtet.

Beim Screening von Eluat 6 fiel eine dezente Verzögerung der Vergiftungskinetik unter Inkubation mit E6F22 und E6F37 auf.

Eluat 3, 5 und 7 zeigten bei der qualitativen lichtmikroskopischen Auswertung des Screenings keine Hinweise auf Hemmeffekte durch die untersuchten Peptidfraktionen. Beim Screening von Eluat 8 traten methodische Probleme (Pipettierfehler) bei zwei der drei Positiv-Kontrollen auf. Im Vergleich untereinander

und zur Positiv-Kontrolle erwies sich keine der Peptidfraktionen auffällig im Sinne einer hemmenden Wirkung auf die Vergiftungskinetik.

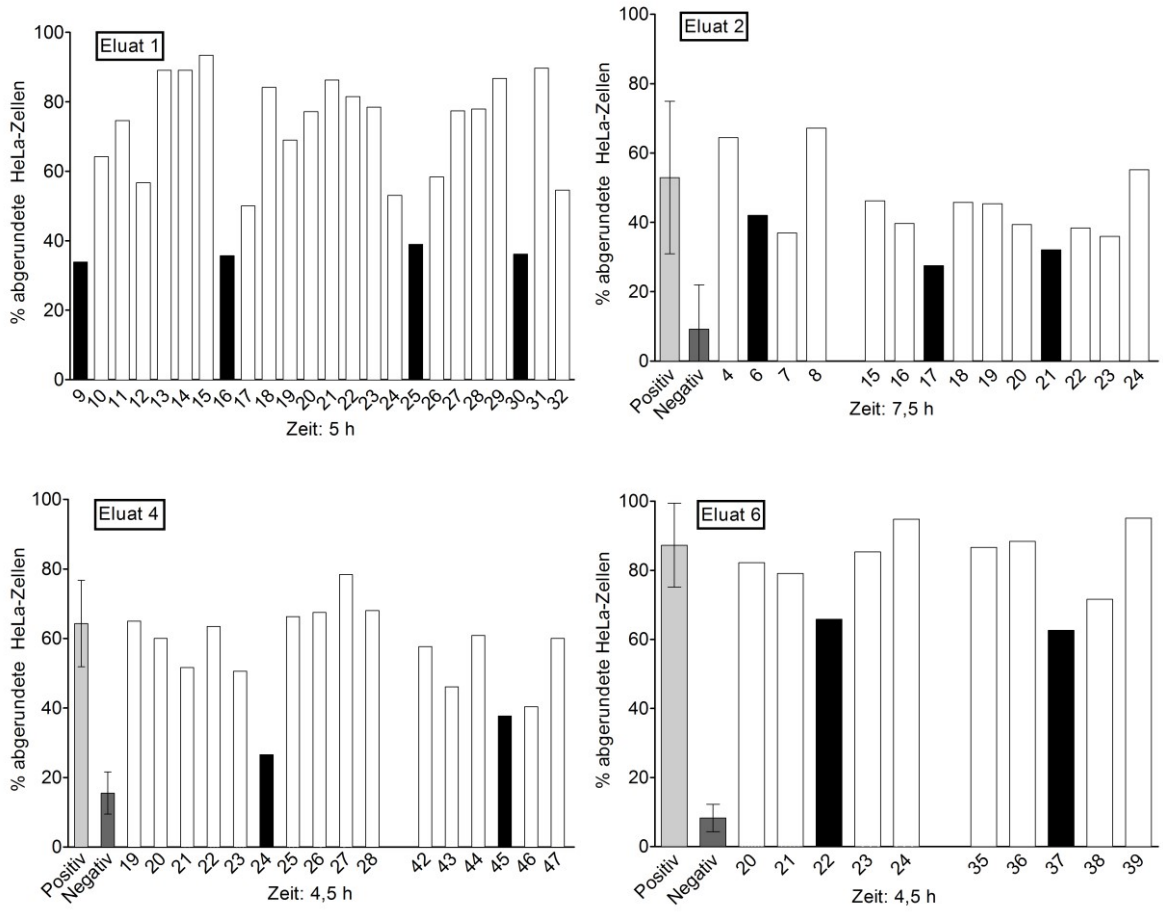



**Abb. 9: Quantitative Auswertung relevanter Peptidfraktionen der 8 Eluate (E 1-8) des Primärscreenings mit Toxin A.**

Dargestellt sind die quantitativen Auswertungen des Primärscreenings in Einzelwerten. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter HeLa-Zellen. Die Nummerierung entlang der X-Achse entspricht der jeweiligen Peptidfraktion. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind jene Peptidfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung eine Verzögerung aufwies. Die Auswertung erfolgte stündlich. Dargestellt sind exemplarisch die Zeitwerte t=4,5 h (E4, E6), t=5 h (E1) und t=7,5 h (E2). Die Werte der Kontrollen (Positiv, Negativ) sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3). Aufgrund von Problemen im Versuchsablauf im Screening von Eluat 1 fehlen Positiv- und Negativ-Kontrollen. Hier ist nur ein Vergleich zwischen den einzelnen Peptidfraktionen möglich. In der graphischen Auswertung des Screenings von Eluat 2 wurde E2F6 statt E2F7 hervorgehoben, da der Hemmeffekt von E2F6 über den gesamten Beobachtungszeitraum deutlicher war.

Im Primärscreening mit Toxin A fielen keine deutlichen Hemmeffekte auf. Unter folgenden, in Abbildung 9 schwarz hervorgehobenen, elf Peptidfraktionen verlief die

Vergiftung jedoch etwas verzögert: Aus Eluat 1 Fraktion 9 (E1F9), Fraktion 16 (E1F16), Fraktion 25 (E1F25) und Fraktion 30 (E1F30), aus Eluat 2 Fraktion 6 (E2F6), Fraktion 17 (E2F17) und Fraktion 21 (E2F21), aus Eluat 4 Fraktion 24 (E4F24) und Fraktion 45 (E4F45), sowie aus Eluat 6 Fraktion 22 (E6F22) und Fraktion 37 (E6F37).

Aus den Eluaten 3, 5, 7 und 8 konnten im Primärscreening keine Peptidfraktionen mit hemmender Wirkung auf die Vergiftung mit Toxin A identifiziert werden. Aufgrund der methodischen Mängel besonders kritisch zu bewerten sind die dargestellten Ergebnisse des Screenings von Eluat 1 und Eluat 2. Vor allem die Diagramme dieser beiden Eluate lassen eine deutliche Schwankungsbreite der Vergiftungskinetik einzelner toxinbehandelter *Wells* erkennen. Im Falle der Positiv-Kontrolle von Eluat 2 äußert sich dies durch die dargestellte Standardabweichung. Die gesehenen, schwach ausgeprägten Unterschiede von E2F6, E2F17 und E2F21 in Einzelwerten stellen so nur ein vages Indiz für einen Hemmeffekt dar. Alle genannten Treffer wurden zur Überprüfung erneut in Dreifachbestimmung untersucht.

### 3.1.2 Überprüfung der auffälligen Peptidfraktionen aus dem Primärscreening

Die elf oben genannten Peptidfraktionen fielen im Primärscreening durch eine vergleichsweise langsamer verlaufende Zellvergiftung auf. Diese Beobachtung sollte in Dreifachbestimmung der einzelnen Peptidfraktionen überprüft und so ein wirklicher Hemmeffekt von einer langsamer verlaufenden Vergiftung im Rahmen der versuchsbedingten Schwankungsbreite abgegrenzt werden. Zusätzlich wurden die Fraktionen E4F1, E4F34 und E6F8 als beliebige, im Primärscreening unauffällige Peptidfraktion untersucht. Bei diesen Peptidkontrollen wurde kein Unterschied zur Positiv-Kontrolle erwartet. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den Abschnitten 2.2.1-2.2.3. Die verwendete Toxin A-Konzentration betrug 40 ng/mL.

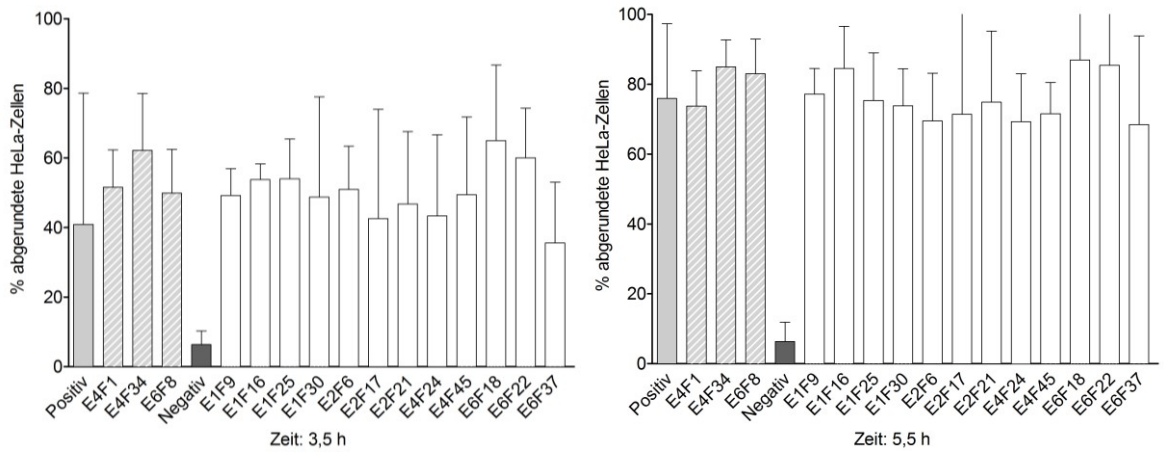



**Abb. 10: Quantitative Auswertung der Überprüfung relevanter Peptidfraktionen aus dem Primärscreening in Dreifachbestimmung.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung zu den exemplarischen Zeitwerten t=3,5 h (links) und 5,5 h (rechts) nach Versuchsbeginn. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter HeLa-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. E4F1, E4F34 und E6F8 (grau-schraffiert) wurden als Kontroll-Peptidfraktion mituntersucht, da aus dem Primärscreening keine Hemmwirkung zu erwarten war. Die Toxin A-Konzentration betrug 40 ng/mL. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Abbildung 10 zeigt eine Übersicht der quantitativen Versuchsauswertung der Dreifachbestimmung zu den Zeitwerten t=3,5 h und 5,5 h. Die Mittelwerte der Peptidfraktionen und der Positiv-Kontrolle liegen zu beiden dargestellten Zeitpunkten auf einem vergleichbaren Niveau. Vor allem zu Vergiftungsbeginn verlief die Vergiftung in einer der drei Positiv-Kontrollen deutlich langsamer. Dies erklärt die Standardabweichung der Positiv-Kontrolle zum Zeitwert t=3,5 h. Zum späteren Zeitwert (t=5,5 h) glichen sich die Unterschiede aus. Es ist ersichtlich, dass keine der untersuchten Peptidfraktionen einen potenten Hemmeffekt auf die Vergiftung von HeLa-Zellen mit Toxin A haben kann. Ob eine schwache Hemmwirkung vorhanden ist kann bei der vorliegenden Standardabweichung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Diese könnte am ehesten von der Peptidfraktion E6F37 ausgehen.

In einem weiteren Versuch wurde E6F37 erneut untersucht. Um einen möglichen, schwachen Hemmeffekt nicht zu übersehen und versuchsbedingte Schwankungen zu minimieren, wurde die Vergiftung in Sechsfachbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde die Toxinkonzentration mit 20 ng/mL bewusst niedrig gewählt um

feine Unterschiede, die in der Frühphase der Vergiftung ausgeprägter zu sein scheinen, besser erkennen zu können.

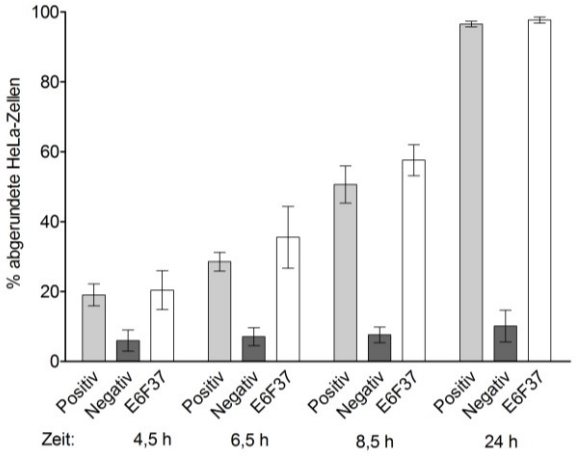



**Abb. 11: Quantitative Auswertung der Überprüfung von E6F37 mit Toxin A.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung im zeitlichen Verlauf (t=4,5 h, 6,5 h, 8,5 h und 24 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter HeLa-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Toxin A-Konzentration betrug 20 ng/ml. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=6).

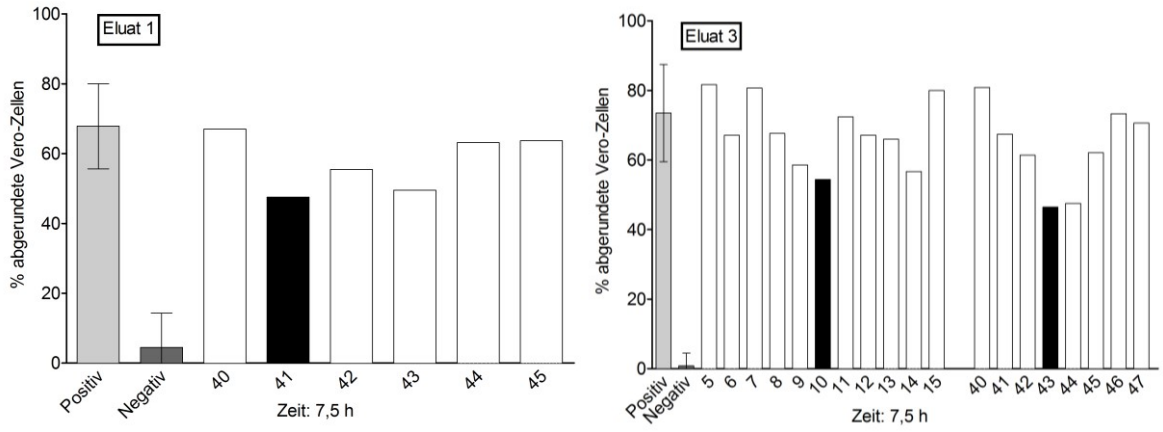
Der in Abbildung 11 dargestellte Vergiftungsverlauf unter Inkubation mit E6F37 zeigt einen langsamen Vergiftungsverlauf. Die Standardabweichung wurde durch den Versuchsansatz in Sechsfachbestimmung minimiert. Ein Hemmeffekt von E6F37 auf die Vergiftung von Toxin A konnte so ausgeschlossen werden.

Aus dem Primärscreening der Peptidbank mit Toxin A ging keine hemmende Peptidfraktion hervor. Es ist erneut darauf hinzuweisen, dass über einige Peptidfraktionen keine Aussage getroffen werden kann. Zwölf Peptidfraktionen fehlten in der Peptidbank und 24 Peptidfraktionen aus Eluat 1 wurden aufgrund methodischer Probleme nicht in die Auswertung eingeschlossen.

## 3.2 Identifizierung und Charakterisierung inhibitorischer Peptide gegen das Toxin CDT

### 3.2.1 Primärscreening der Peptidbank (Charge 040823) zur Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen CDT

Das Primärscreening der Peptidbank auf hemmende Peptidfraktionen gegen CDT verlief analog zu den Vorversuchen mit Toxin A. Die Zellvergiftungsversuche erfolgten auf Vero-Zellen. Das Screening erfolgte mit der Peptidbank der Charge 040823, welche im 5 L HF-Äquivalent vorlag. Die Peptidfraktionen wurden mit 200 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht. Dies entspricht einer Äquivalentkonzentration von c(P)=0,025 $\frac{L\,HF}{\mu L}$, also einem 2,5x höheren Maßstab als Charge 050905, mit welcher das Screening mit Toxin A durchgeführt wurde. Jede Zellkammer wurde mit 10 µL Peptidlösung behandelt. Die Peptidfraktion 19 aus Eluat 6 (E6F19) fehlte in der Charge 040823 und ist deshalb nicht Teil der folgenden Auswertungen. Die verwendete Toxinkonzentration wurde für jeden Vergiftungsversuch an die Konfluenz der verwendeten Zellkultur angepasst und wird im Folgenden vereinfacht als CDT für CDTa/CDTb in ng/mL angegeben. Es werden nur jene Versuchsauswertungen gezeigt, bei welchen Peptidfraktionen einen potentiellen Hemmeffekt zeigten und so für die Mehrfachbestimmung in Frage kamen.



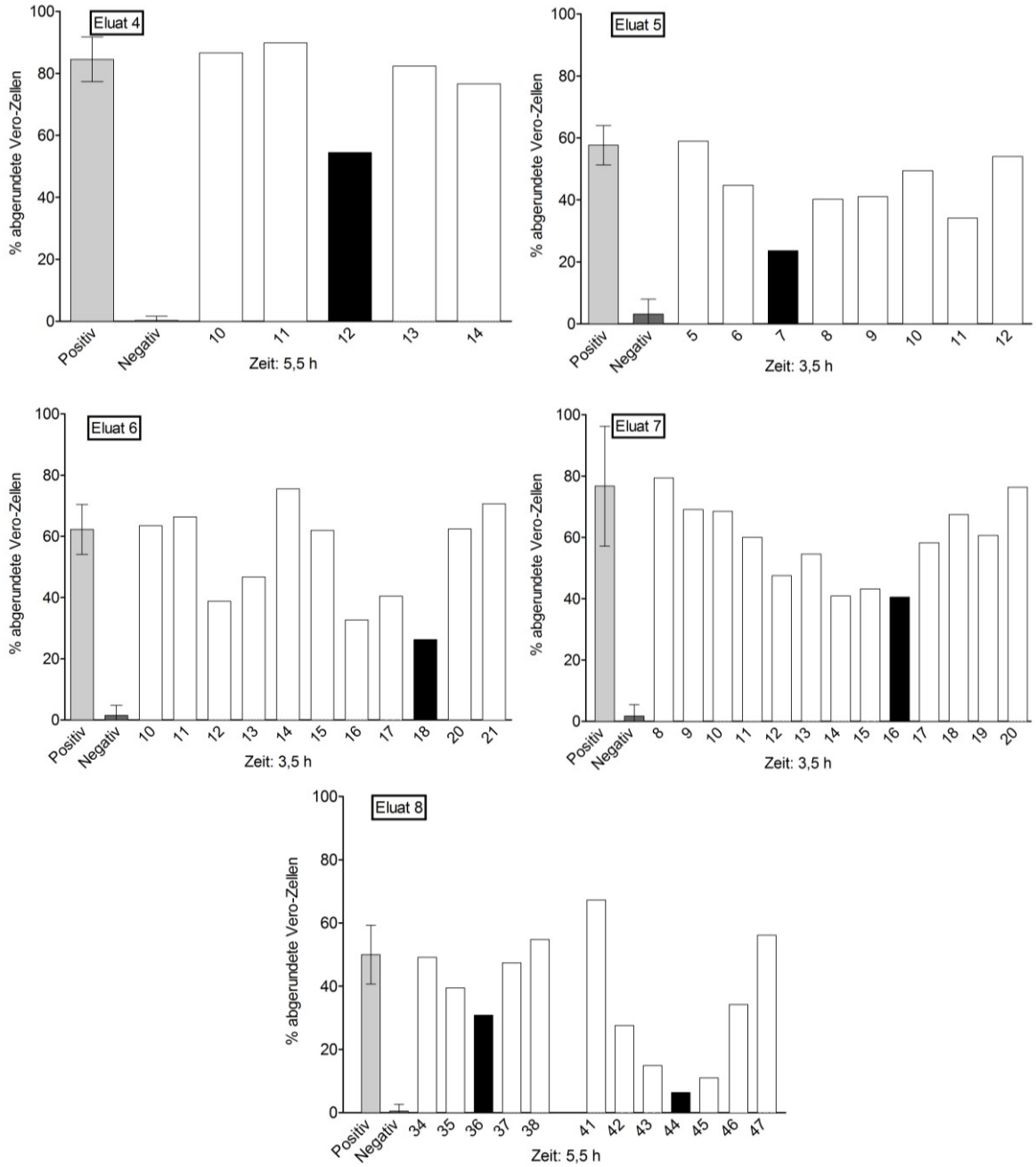


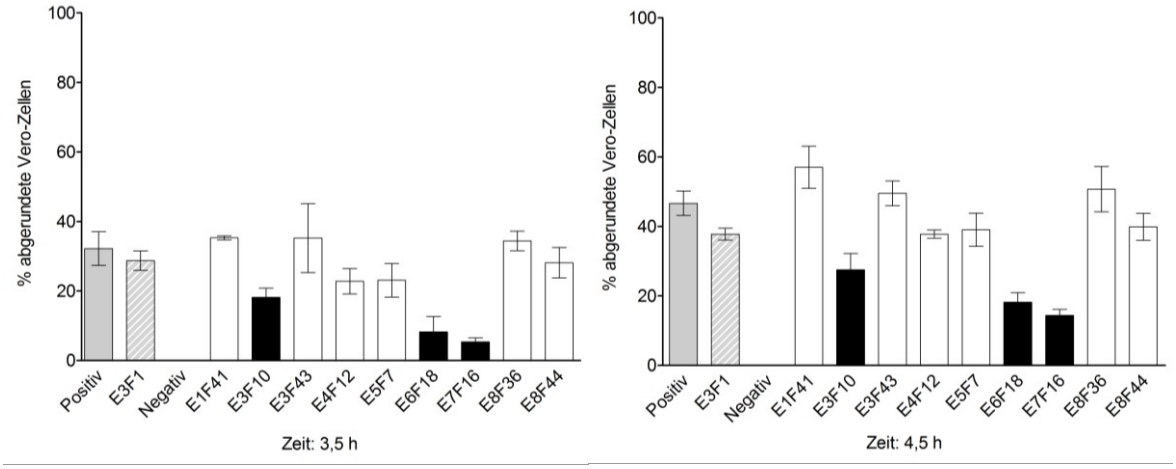

**Abb. 12: Quantitative Auswertung relevanter Peptidfraktionen der 8 Eluate (E 1-8) des Primärscreenings mit CDT.**

Dargestellt sind die quantitativen Auswertungen des Primärscreenings in Einzelwerten. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Nummerierung entlang der X-Achse entspricht der jeweiligen Peptidfraktion. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Peptidfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Dargestellt sind exemplarisch die Zeitpunkte t=3,5 h (E5, E6, E7), t=5,5 h (E4, E8) und t=7,5 h (E1, E2). Die Toxinkonzentration wurde abhängig von der Zelldichte gewählt: E1, E3, E8: 35/70; E4: 50/100; E5, E6, E7: 40/80 (CDTa/CDTb in [ng/mL]). Die Werte der Kontrollen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Die Ergebnisse des Primärscreenings sind in Abbildung 12 dargestellt. In Eluat 2 konnten keine Peptidfraktionen mit inhibitorischen Effekten festgestellt werden. Die übrigen Eluate lieferten die in Abbildung 9 schwarz hervorgehobenen Peptidfraktionen: Eluat 1 Fraktion 41 (E1F41), Eluat 3 Fraktion 10 (E3F10), Eluat 3 Fraktion 43 (E3F43), Eluat 4 Fraktion 12 (E4F12), Eluat 5 Fraktion 7 (E5F7), Eluat 6 Fraktion 18 (E6F18), Eluat 7 Fraktion 16 (E7F16), Eluat 8 Fraktion 36 (E8F36) und Eluat 8 Fraktion 44 (E8F44). Diese zeigten im Einzelwert einen deutlich geringeren Anteil abgerundeter Vero-Zellen als die Positiv-Kontrolle und setzten sich von Nachbarfraktionen, die mitunter ebenfalls hemmende Wirkungen aufwiesen, zum Teil graduell ab.

### 3.2.2 Überprüfung der auffälligen Peptidfraktionen aus dem Primärscreening in Dreifachbestimmung.

Neun Peptidfraktionen, welche im Primärscreening unter Einfachbestimmung eine Verzögerung der Vergiftungskinetik zeigten, wurden in diesem Versuch erneut untersucht. Ziel der Dreifachbestimmung war es den vermuteten Hemmeffekt zu überprüfen. So sollte ein wirklicher Hemmeffekt von einer im Rahmen der normalen Schwankungsbreite langsamer verlaufenden Vergiftung abgegrenzt werden. Zusätzlich wurde Fraktion E3F1 als beliebige, im Vorversuch unauffällige Peptidfraktion vergleichend mituntersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den Abschnitten 2.2.1-2.2.3. Die verwendete CDT-Toxinkonzentration betrug 35/75 ng/mL.



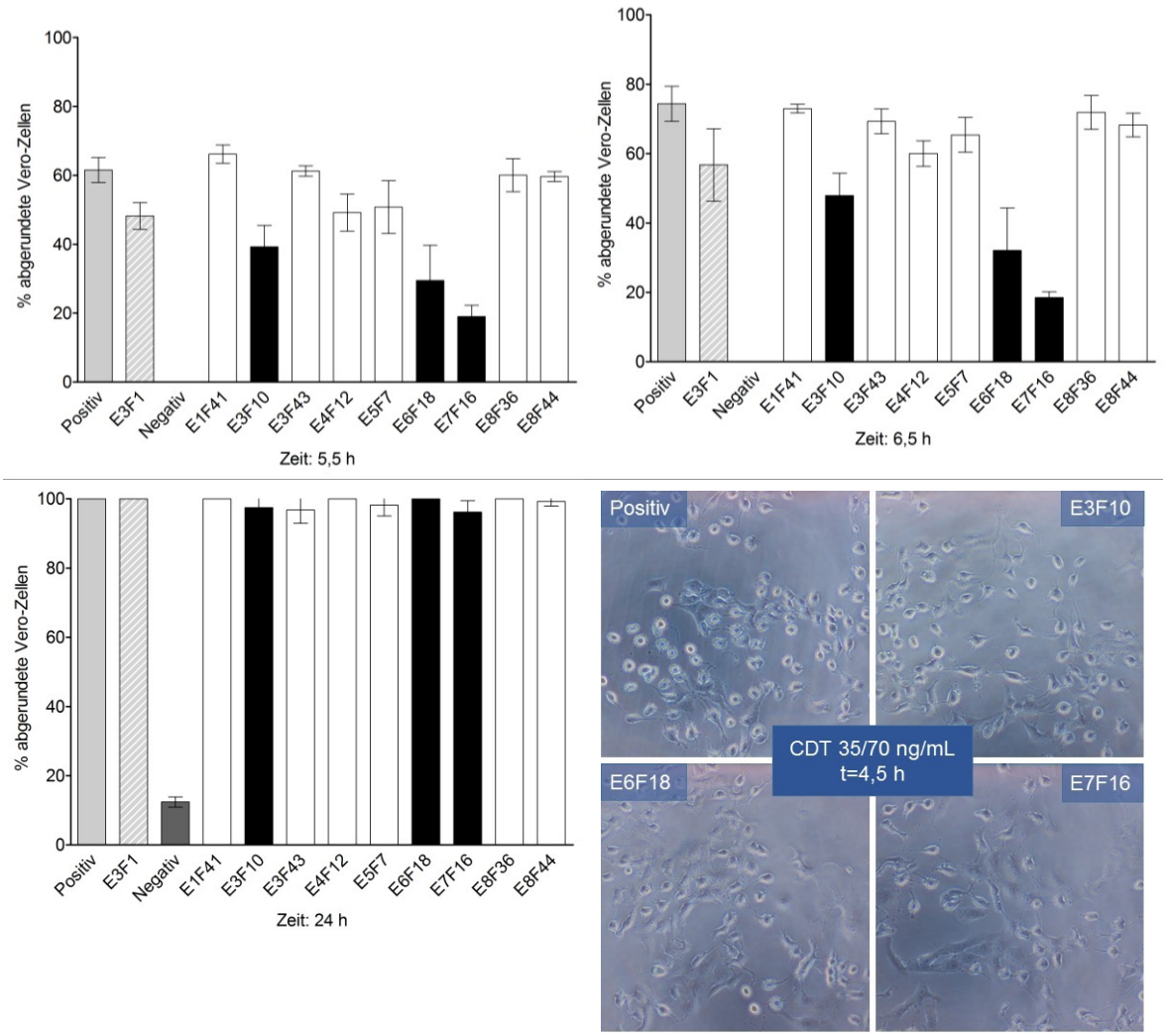



**Abb. 13: Auswertung der Überprüfung relevanter Peptidfraktionen aus dem Primärscreening in Dreifachbestimmung**

Die Balkendiagramme zeigen die quantitative Versuchsauswertung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (t=3,5 h, 4,5 h, 5,5 h, 6,5 h und 24 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Peptidfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. E3F1 (grau-schraffiert) wurde als Kontroll-Peptidfraktion mituntersucht, da aus dem Primärscreening keine Hemmwirkung zu erwarten war. Die Zellvergiftung erfolgte mit CDT 35/70 ng/mL. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3). Im rechten, unteren Bildabschnitt sind exemplarisch repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der drei Trefferfraktionen, sowie der Positiv-Kontrolle bei 20 x Vergrößerung zum Zeitpunkt t=4,5 h dargestellt. Es wurde jeweils die Aufnahme ausgewählt, welche nach Auszählung dem Mittelwert am nächsten lag.

Die Versuchsauswertung ist in Abbildung 13 dargestellt. Von den im Vorversuch auffälligen neun Peptidfraktionen ließen sich nun lediglich die Fraktionen E3F10,

E6F18 und E7F16 von der Positiv-Kontrolle und der Kontrollfraktion E3F1 abgrenzen. Der Vergiftungsverlauf unter Inkubation mit E3F1 verlief dabei etwas langsamer als die Positiv-Kontrolle. Die marginalen Unterschiede von E4F12, E5F7 und E8F44 im Vergleich zur Positiv-Kontrolle sind deshalb nicht als Hemmeffekt, sondern eher im Rahmen der normalen Schwankungsbreite zu werten. In Abbildung 13 ist außerdem eine exemplarische Übersicht der lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Es wurde jeweils jene der drei Aufnahmen ausgewählt, welche nach Auszählung dem Mittelwert am nächsten lag. Der Hemmeffekt und die unterschiedliche Hemmstärke der drei Fraktionen lassen sich gut darstellen. Vero-Zellen, die mit Peptidmaterial der drei Fraktionen inkubiert wurden, zeigten nach 4,5 h geringere Vergiftungserscheinungen als die unbehandelten Zellen der Positiv-Kontrolle. Deutlich zeigte sich der inhibitorische Effekt vor allem unter den beiden Fraktionen E6F18 und E7F16. Dieser Hemmeffekt war über den gesamten Beobachtungszeitraum am Vergiftungstag nachweisbar. Die Hemmwirkung von E3F10 zeigte sich schwächer und ließ sich nicht durchgängig von der Kontrollfraktion E3F1 abgrenzen. Nach 24 h waren nahezu alle Zellen abgerundet (nicht abgebildet). Es waren keine nennenswerten Unterschiede mehr erkennbar.

### 3.2.3 Versuche zur Bestätigung des Hemmeffekts identifizierter Peptidfraktionen und Untersuchung der Wirkung auf andere bakterielle Toxine

Der festgestellte Hemmeffekt der drei Peptidfraktionen auf CDT sollte erneut überprüft und auf andere Toxine vergleichend untersucht werden. Obschon beim Screening der Peptidbank mit Toxin A keine hemmende Peptidfraktion identifiziert werden konnte, schien es sinnvoll die aus dem CDT-Screening mit einer anderen Peptidbank hervorgegangenen Treffer hinsichtlich ihrer Wirkung auf Toxin A zu überprüfen. Von Interesse war außerdem das binäre C2-Toxin von *C. botulinum*, welches durch die strukturelle Verwandtschaft mit CDT gekennzeichnet ist und in der AG Barth bereits Gegenstand von Peptidversuchen war.

### 3.2.3.1 Vergleichende Untersuchung der Wirkung von E3F10 und E7F16 auf die Toxine CDT, Toxin A und C2 auf Vero-Zellen.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den Abschnitten 2.2.1-2.2.3 auf 96-*Well* Mikrotiterplatten mit Vero-Zellen. Die Toxine wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: CDT 35/70 ng/mL, Toxin A 30 ng/mL, C2 200/400 ng/mL.

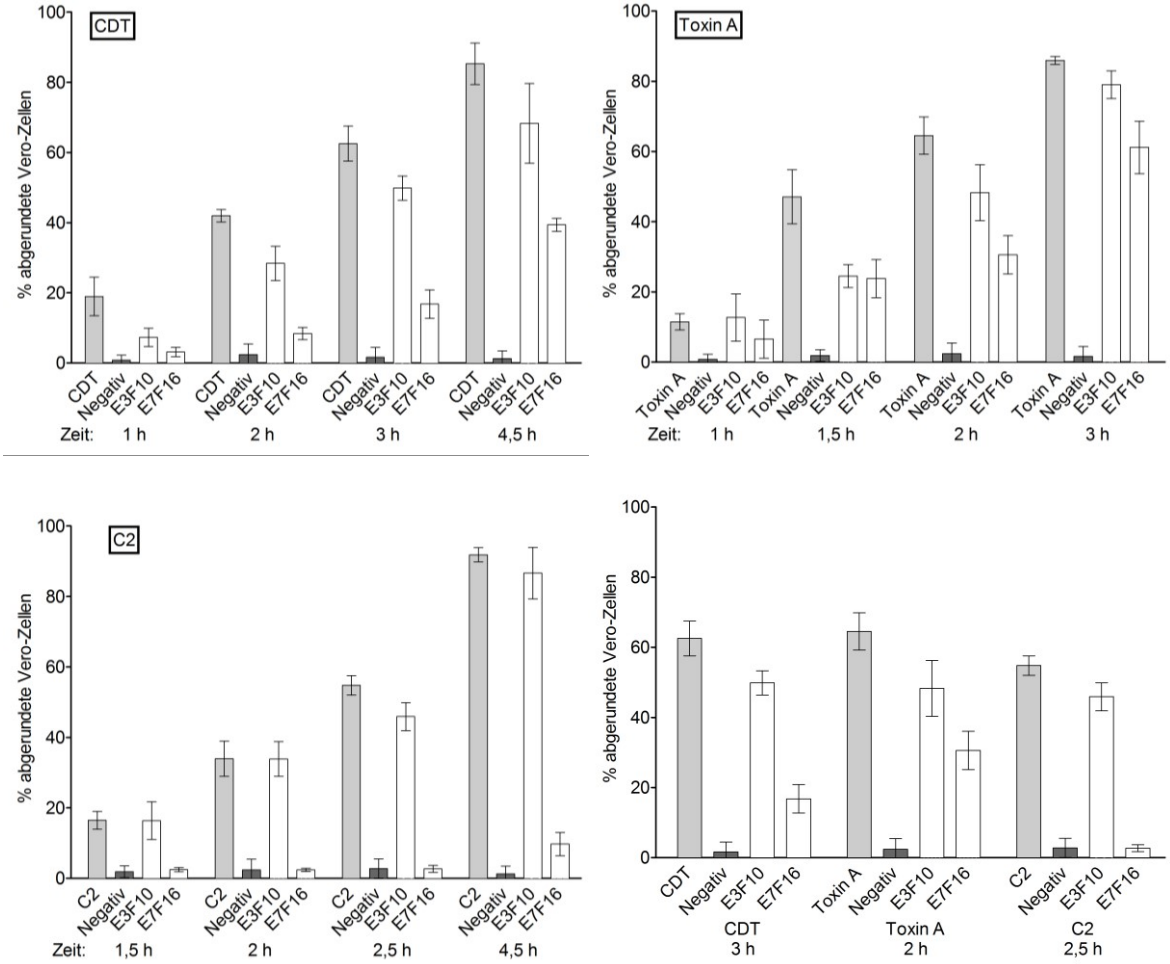



**Abb. 14: Quantitative Auswertung der Zellvergiftung zur vergleichenden Untersuchung von E3F10 und E7F16 mit den Toxinen CDT, Toxin A und C2.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung der drei Toxine zu jeweils vier Zeitwerten. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Jedes Toxin wurde mit den beiden zu testenden Peptidfraktionen E3F10 und E7F16 (weiße Balken) inkubiert. Die Toxinkonzentrationen wurden wie folgt gewählt: CDT 35/70 ng/mL, Toxin A 30 ng/mL, C2 200/400 ng/mL. Im rechten unteren Schaubild sind Vergiftungen aller drei Toxine zu jeweils einem vergleichbaren Zeitwert (CDT: t=3 h, Toxin A: t=2 h, C2: t=2,5 h), nachdem etwa 60 % aller Vero-Zellen abgerundet waren, abgebildet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Abbildung 14 zeigt vier Diagramme in welchen sich die Effekte der beiden Peptidfraktionen auf die drei Toxine gut erkennen lassen. Der Hemmeffekt beider Peptidfraktionen auf CDT ließ sich erneut reproduzieren und zeigte wiederholt die deutlich potentere Hemmwirkung von E7F16 im Vergleich zu E3F10. Auch die Zellvergiftung mit Toxin A wurde durch beide Peptidfraktionen verzögert. Der gesehene Effekt war jedoch vor allem für E7F16 schwächer ausgeprägt als unter CDT beobachtet. Der Hemmeffekt von E3F10 auf Toxin A war in diesem Versuch zu Beginn und zum Ende der Beobachtungszeit nur sehr schwach. Von Interesse war außerdem die Untersuchung der beiden Peptidfraktionen mit dem CDT-verwandten Toxin C2 von *C. botulinum*. Hier zeigte die Peptidfraktion E7F16 eine ausgesprochen potente Hemmwirkung, welche alle bislang gesehenen Hemmeffekte übertraf. Bemerkenswerterweise konnte E3F10 die Vergiftung mit dem C2-Toxin allenfalls marginal beeinflussen.

#### 3.2.3.2 Überprüfung der Wirkung von E6F18 auf Toxin A und Untersuchung der Hemmstärke auf CDT und Toxin A in unterschiedlicher Peptiddosierung.

In Vorarbeiten der AG Barth von S. Fischer und V. Hegenauer konnte in Zellvergiftungsversuchen bereits E6F18 (Charge 040823) als Peptidfraktion mit inhibitorischer Wirkung gegen die Vergiftung mit dem Diphtherie-Toxin, dem C2-Toxin und dem Iota-Toxin identifiziert werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte beim Screening der Peptidbank mit dem Toxin CDT die Peptidfraktion E6F18 ebenfalls als hemmende Fraktion identifiziert und bestätigt werden. Vor der Weiterverfolgung von E6F18 in folgenden Auftrennungszyklen, sollte die Hemmwirkung auch auf Toxin A von *C. difficile* überprüft und die Hemmstärke in Abhängigkeit der Dosierung des Peptidmaterials untersucht werden.

Die Untersuchung der Wirkung von E6F18 (Charge 040823) auf Toxin A erfolgte analog zum Versuch in Abschnitt 3.1.2, in welchem E6F37 mit Toxin A in Sechsfachbestimmung untersucht wurde. Wie im Primärscreening mit Toxin A erfolgte die Vergiftung mit HeLa-Zellen. Die Toxin A-Konzentration wurde mit 20 ng/mL bewusst niedrig gewählt um einen schwachen Hemmeffekt in der Frühphase der Vergiftung nicht zu übersehen. Aus Vorversuchen mit E6F18 (Charge 040823)

von V. Hegenauer wurde der AG Barth ein Aliquot im 33 L HF-Äquivalent bereitgestellt. Dieses Aliquot wurde mit 600 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht und bot so ausreichend Volumen für weitere Versuche zur Charakterisierung des Hemmeffekts. Zur besseren Übersicht der einzelnen Peptidlösungen sind die bisher verwendeten Peptidfraktionen in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10:** Übersicht bereitgestellter Peptid-Chargen mit zugehöriger Äquivalenzkonzentration

| Charge | Verwendung | Maßstab [L HF] | Lösung ($H_2O$ *bidest*) [yL] | Äquivalentkonzentration c(P) $[\frac{L\ HF}{\mu L}]$ |
|---|---|---|---|---|
| 050905 | Toxin A Screening | 2 | 200 | 0,01 |
| 040823 | CDT Screening | 5 | 200 | 0,025 |
| 040823 (E6F18 Aufreinigung) | Hemmeffekt-Charakterisierung | 33 | 600 | 0,055 |

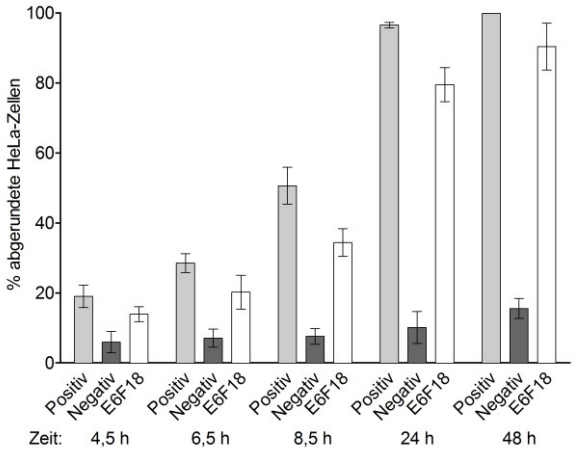



**Abb. 15: Quantitative Auswertung der Überprüfung von E6F18 mit Toxin A.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung im zeitlichen Verlauf (t=4,5 h, 6,5 h, 8,5 h, 24 h und 48 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter HeLa-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Toxin A-Konzentration betrug 20 ng/mL. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=6).

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 15 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Zellvergiftung mit Toxin A unter Inkubation mit E6F18 etwas verzögert

verlief. Zu Beginn (t=4,5 h) ist der Unterschied allenfalls geringfügig ausgeprägt. Ab 6,5 h ist ein schwacher Hemmeffekt deutlich erkennbar. Der Unterschied bleibt über 48 h erhalten. Nach 54 h waren auch unter Inkubation mit E6F18 alle Zellen abgerundet (nicht abgebildet).

Um die Auswirkung der Dosierung des Peptidmaterials auf den Hemmeffekt einschätzen zu können, wurde im Anschluss E6F18 in drei unterschiedlichen Verdünnungen im Vergiftungsversuch eingesetzt und zunächst mit CDT untersucht. Um die gewünschte Peptidkonzentration im *Well* c(W) zu erzielen, wurde das benötigte Volumen der Peptidlösung nach dem Pipettierschema in Tabelle 11 berechnet.

**Tabelle 11:** Pipettierschema für E6F18 (Charge 040823, neue Aufreinigung) zur Staffelung der Peptiddosierung

| Dosierung | Äquivalentkonzentration der Ausgangsfraktion c(P) $[\frac{L\,HF}{\mu L}]$ | Zielkonzentration im *Well* c(W) $[\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}]$ | Neues Volumen der Peptidlösung pro *Well [µL]* |
|---|---|---|---|
| L (groß) | 0,055 | 0,005 | 9,1 |
| M (mittel) | | 0,0025 | 4,54 |
| S (klein) | | 0,00125 | 2,27 |

Es wurden wieder zwei Kontrollpeptidfraktionen eingesetzt von welchen kein Hemmeffekt zu erwarten war. Die Fraktion E4F1 aus der Charge 050905 wurde entsprechend der Dosierung „S“ angelegt. Fraktion E8F30 aus der Charge 040823 wurde als Kontrollpeptidfraktion in der Dosierung „M“ vorbereitet. Für die höchste Dosierung „L“ stand keine Kontrollpeptidfraktion zur Verfügung, da zu viel Volumen von den Peptidfraktionen aus der Peptidbank notwendig gewesen wäre. Der Versuch erfolgte auf Vero-Zellen. Die CDT-Konzentration betrug 40/80 ng/mL.

In Abbildung 16 ist erneut der Hemmeffekt von E6F18 auf CDT zu erkennen. Unter den Peptidkontrollen war keine Hemmwirkung zu verzeichnen. Mit absteigender Peptiddosierung zeichnete sich tendenziell auch eine nachlassende Hemmstärke ab. Die Unterschiede waren jedoch schwach ausgeprägt. Auch in der niedrigsten Dosierung „S“, welche näherungsweise dem Maßstab der Peptidfraktionen der

Charge 050905 (2 L HF-Äquivalent) aus dem Primärscreening mit Toxin A entspricht, konnte ein deutlicher Hemmeffekt nachgewiesen werden.

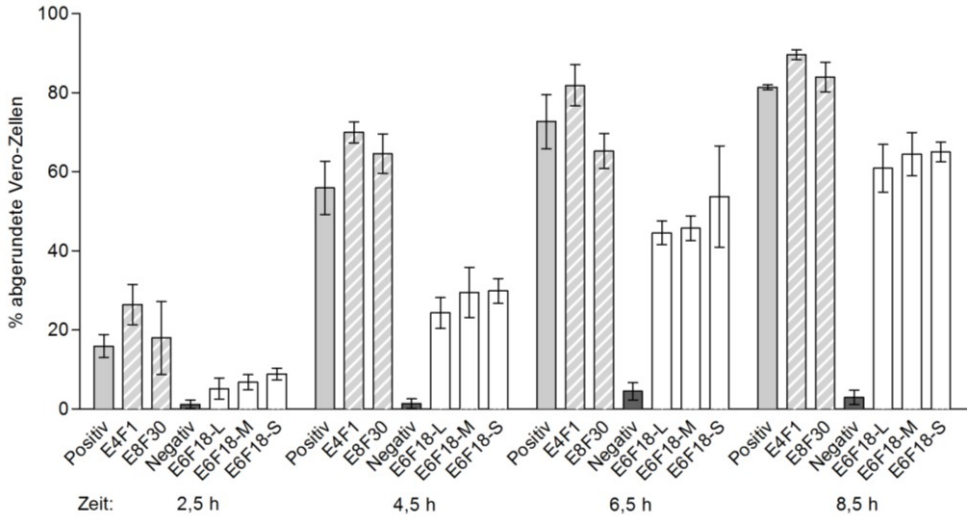



**Abb. 16: Quantitative Auswertung der Überprüfung von E6F18 in unterschiedlicher Dosierung mit CDT.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung im zeitlichen Verlauf (t=2,5 h, 4,5 h, 6,5 h und 8,5 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die CDT-Konzentration betrug 40/80 ng/mL. Peptidkontrollen sind grau-schraffiert dargestellt. Die Dosis von E6F18 wurde in absteigender Reihenfolge von „L“ über „M“ zu „S“ jeweils halbiert. Die entsprechenden Peptidkonzentrationen können Tabelle 12 entnommen werden. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Von großem Interesse war die Überprüfung des festgestellten Hemmeffekts von E6F18 (Charge 040823) auf Toxin A in unterschiedlichen Peptiddosierungen. Insbesondere angesichts der Tatsache, dass E6F18 im Primärscreening von Toxin A nicht als hemmende Peptidfraktion identifiziert werden konnte, sollte der Einfluss der Peptiddosierung auf die Stärke der Hemmwirkung in diesem Falle genau untersucht werden.

Da die gewählten drei Peptiddosierungen im Vorversuch mit CDT nur sehr geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer Hemmstärke zeigten, wurden diese nun in höheren Verdünnungen gestaffelt, wie aus Tabelle 12 zu entnehmen ist. Als Peptidkontrolle wurde E6F8 der Charge 050905 in den Dosierungen „M“ und „S“ mituntersucht. Die Konzentration von Toxin A betrug 40 ng/mL. Der Versuch wurde auf HeLa-Zellen durchgeführt.

**Tabelle 12:** Pipettierschema für E6F18 (Charge 040823, neue Aufreinigung) zur Staffelung der Peptiddosierung

| Dosierung | Äquivalentkonzentration der Ausgangsfraktion c(P) [$\frac{L\,HF}{\mu L}$] | Zielkonzentration im *Well* c(W) [$\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$] | Neues Volumen der Peptidlösung pro *Well* *[µL]* |
|---|---|---|---|
| L (groß) | 0,055 | 0,005 | 9,1 |
| M (mittel) | | 0,001 | 1,82 |
| S (klein) | | 0,0001 | 0,18 |

Abbildung 17 zeigt die Versuchsergebnisse. Der bereits gesehene Hemmeffekt von E6F18 (Charge 040823) konnte in der Dosierung „L“ mit c(W)=0,005 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$ erneut bestätigt werden. Diese Dosis entspricht etwa der zweifachen c(W) in welcher das CDT-Primärscreening durchgeführt wurde.

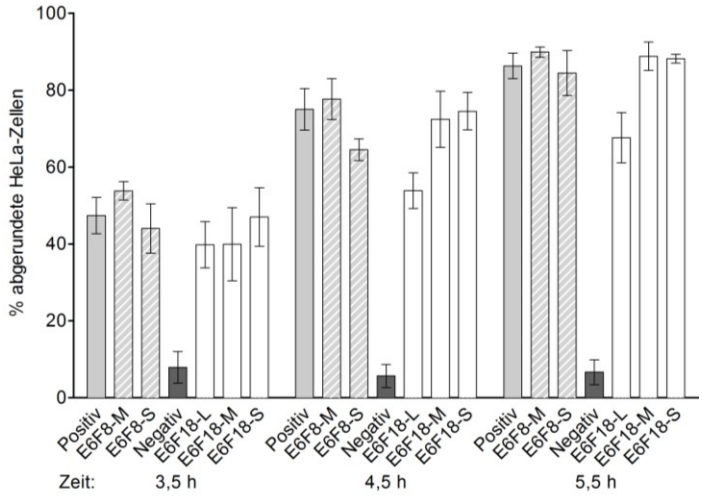



**Abb. 17: Quantitative Auswertung der Überprüfung von E6F18 in unterschiedlicher Dosierung mit Toxin A.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung im zeitlichen Verlauf (t=3,5 h, 4,5 h und 5,5 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter HeLa-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Toxin A-Konzentration betrug 40 ng/mL. E6F8 (grau-schraffiert) wurde als Peptidkontrolle in der Dosierung „M“ und „S“ mituntersucht. Die Dosis von E6F18 wurde in absteigender Reihenfolge von „L“ über „M“ zu „S“ reduziert. Die entsprechenden Peptidkonzentrationen können Tabelle 12 entnommen werden. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Der Hemmeffekt war erneut schwach ausgeprägt, jedoch über alle Zeitwerte feststellbar. Richtungsweisend sind die Resultate der niedriger dosierten Proben. E6F18 in der Dosierung „M“ lies nur im ersten Zeitwert nach 3,5 h einen vergleichbaren Hemmeffekt erkennen, welcher sich im Verlauf rasch egalisierte. Diese Dosis entspricht dem 2 L HF-Äquivalent der Charge 050905 mit der das Toxin A-Screening durchgeführt wurde. In der niedrigsten Dosierung „S“ war zu keinem Zeitpunkt eine Hemmwirkung erkennbar. Dass sich der zuvor bestätigte Hemmeffekt bei Anwendung der Peptidlösung im 2 L HF-Äquivalent verliert, liefert eine weitere mögliche Erklärung für das erfolglose Primärscreening mit Toxin A. Die Peptidkontrollen E6F8 in der Dosierung „M“ und „S“ zeigten eine mit der Positiv-Kontrolle vergleichbare Vergiftungskinetik. Zum Zeitwert t=4,5 h erschien die Vergiftung unter der Dosierung „S“ etwas verzögert.

Aus dem Peptidbankscreening der Charge 040823 mit dem Toxin CDT resultierten die drei hemmenden Peptidfraktionen E3F10, E6F18 und E7F16 mit in genannter Reihenfolge ansteigender Hemmpotenz. Der Hemmeffekt konnte in schwächerem Ausmaß für alle drei Fraktionen auch unter Toxin A reproduziert werden. E6F18 und E7F16 zeigten die stärkste Hemmwirkung auf das C2-Toxin, während E3F10 auf dieses Toxin kaum Einfluss zu haben scheint. Am Beispiel der Wirkung von E6F18 auf die beiden Toxine CDT und Toxin A konnte die Abhängigkeit der Hemmstärke von der Peptiddosierung demonstriert und eine mögliche Erklärung für das erfolglose Peptidbankscreening mit Toxin A gegeben werden.

## 3.3 Verfolgung des Hemmeffekts von E6F18 auf das Toxin CDT in weiteren rechromatographischen Auftrennungszyklen

### 3.3.1 Untersuchung der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT

Durch erneute *Reversed-Phase* Chromatographie (RPC) wurde E6F18 der Charge 040823 in 42 Subfraktionen zu je 20 L HF-Äquivalent von Herrn Dr. Ludger Ständker aufgetrennt und der AG Barth bereitgestellt. Die einzelnen Subfraktionen wurden mit 200 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht und je 10 µL Peptidvolumen pro *Well*

zugeführt. Daraus resultiert eine Peptidkonzentration im *Well* von c(W)=0,01 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$.

Zusätzlich wurde eine neue Aufreinigung der Ausgangsfraktion E6F18 im 10 L HF-Äquivalent bereitgestellt und vergleichend mituntersucht. Diese Ausgangsfraktion wurde ebenfalls mit 200 µL $H_2O$ *bidest* in gelöst und je 10 µL Peptidvolumen pro *Well* zugeführt.

#### 3.3.1.1 Primärscreening der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit den Toxinen CDT und C2

Analog zum ersten Screening der Peptidbank wurde auch zur Untersuchung der ersten rechromatographischen Auftrennung von E6F18 ein Primärscreening in Einzelwerten gemäß Abschnitt 2.2.1-2.2.3 durchgeführt. Peptidfraktionen, die lichtmikroskopisch den Hinweis auf einen Hemmeffekt zeigten, wurden quantitativ ausgewertet. Zellmorphologische Unstimmigkeiten in Vorversuchen veranlassten zur Reduktion der CDTb-Konzentration, da etwaige Eigeneffekte bei hohen Konzentrationen von CDTb vorbeschrieben waren. Die CDT-Toxinkonzentration betrug in diesem Versuch 40/40 ng/mL. Das Screening erfolgte auf Vero-Zellen.

Die Ergebnisse des Primärscreenings sind in Abbildung 18 dargestellt. Der Hemmeffekt von E6F18 konnte auch mit der neuen Aufreinigung mit ausgeprägter Hemmstärke gezeigt werden. Keine der Subfraktionen erzielte einen vergleichbaren Hemmeffekt. Vielmehr schien sich ein schwacher Hemmeffekt über die Subfraktionen E6F18.SF16 bis E6F18.SF25 zu verteilen. Vergleichsweise am stärksten zeigte sich die Vergiftungsverzögerung unter den Subfraktionen E6F18.SF19 und E6F18.SF22.

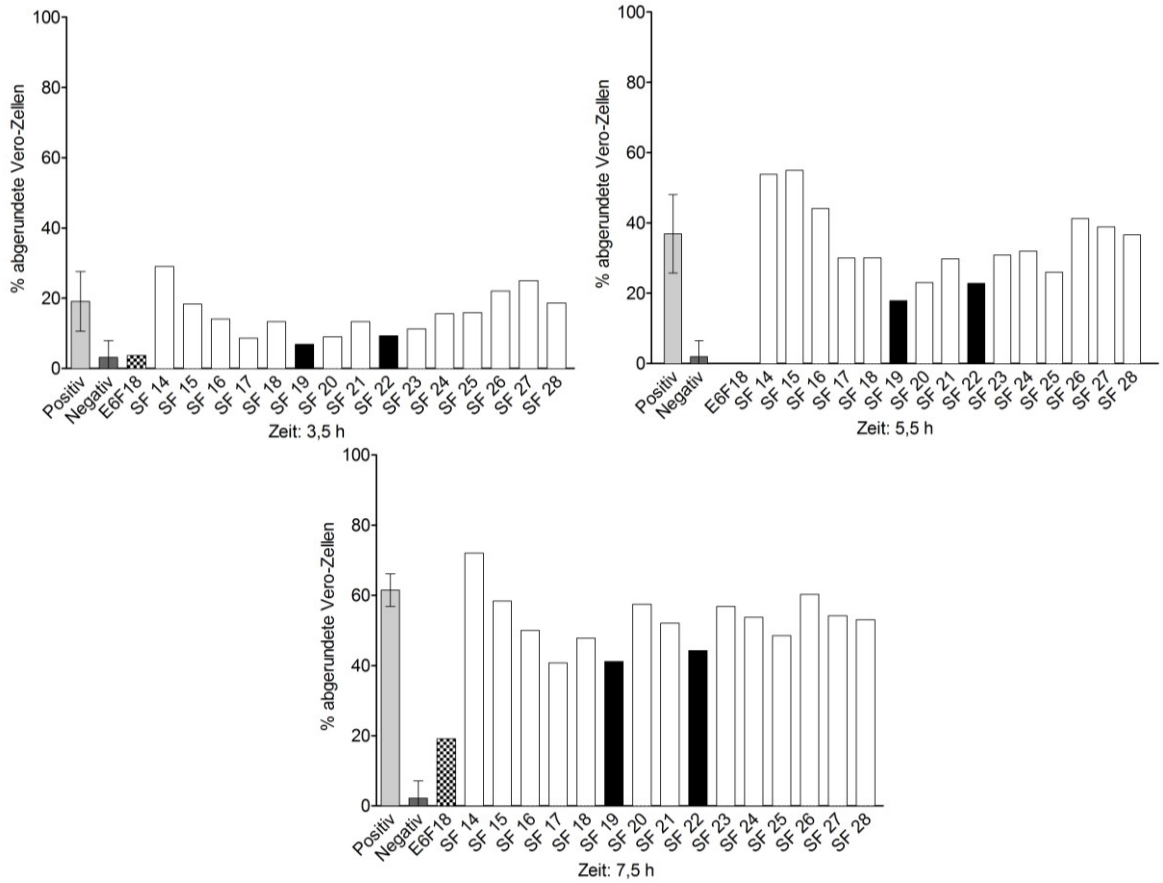



**Abb. 18: Quantitative Auswertung relevanter Subfraktionen des Primärscreenings der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT.**

Dargestellt sind die quantitativen Auswertungen des Primärscreenings in Einzelwerten. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Ausgangsfraktion E6F18 ist schwarz-weiß kariert dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Subfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Exemplarisch sind die Zeitpunkte t=3,5 h, 5,5 h und 7,5 h dargestellt. Die Toxinkonzentration betrug 40/40 ng/mL. Die Werte der Kontrollen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Da der Hemmeffekt von E6F18 zuvor in noch deutlicherer Potenz für das C2-Toxin nachgewiesen wurde, sollte eine vergleichende Untersuchung der ersten Auftrennungsstufe auch für dieses Toxin erfolgen. Hierfür wurde ein Vergiftungsversuch mit Vero-Zellen unter Inkubation mit den relevanten Subfraktionen E6F18.SF15 bis E6F18.SF26 durchgeführt. Die C2-Konzentration betrug 75/150 ng/mL.

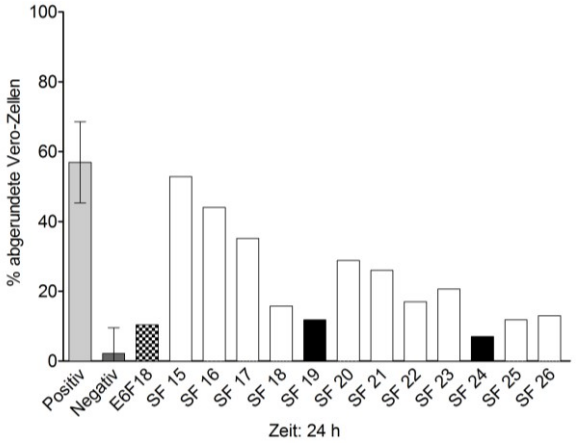



**Abb. 19: Quantitative Auswertung relevanter Subfraktionen des Primärscreenings der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit C2.**

Dargestellt sind die quantitativen Auswertungen des Primärscreenings in Einzelwerten. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Ausgangsfraktion E6F18 ist schwarz-weiß kariert dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Subfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Exemplarisch ist der Zeitwert t=24 h dargestellt. Die Toxinkonzentration betrug 75/150 ng/mL. Die Werte der Kontrollen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Abbildung 19 stellt exemplarisch die quantitative Auswertung zum Zeitwert t=24 h einer sehr langsam verlaufenden Vergiftung dar. E6F18 zeigte, wie im Versuch mit CDT, einen deutlichen Hemmeffekt. Der Hemmeffekt innerhalb der Subfraktionen verteilte sich auch bei Verwendung des C2-Toxins über mehrere Proben, jedoch in wesentlich stärkerer Ausprägung als unter CDT gesehen. Den deutlichsten Hemmeffekt zeigten in diesem Primärscreening ebenfalls E6F18.SF19, sowie zusätzlich E6F18.SF24, welche sich unter CDT als eher unauffällig erwies.

#### 3.3.1.2 Überprüfung der auffälligen Subfraktionen aus dem Primärscreening

Das Primärscreening der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 lieferte für CDT und C2 jeweils zwei Subfraktionen deren Überprüfung in Dreifachbestimmung durchgeführt werden sollte. E6F18.SF19 schien bei beiden Toxinen eine hemmende Wirkung zu besitzen. Das CDT-Screening lieferte als zusätzlichen Treffer E6F18.SF22, während E6F18.SF24 eine stärkere Wirkung auf das C2-Toxin zeigte.

Die Dreifachbestimmung erfolgte auf Vero-Zellen. Die Toxinkonzentration betrug für CDT 40/60 ng/mL und für C2 250/500 ng/mL. Als Peptidkontrolle wurde E6F18.SF2 für beide Toxine mituntersucht.

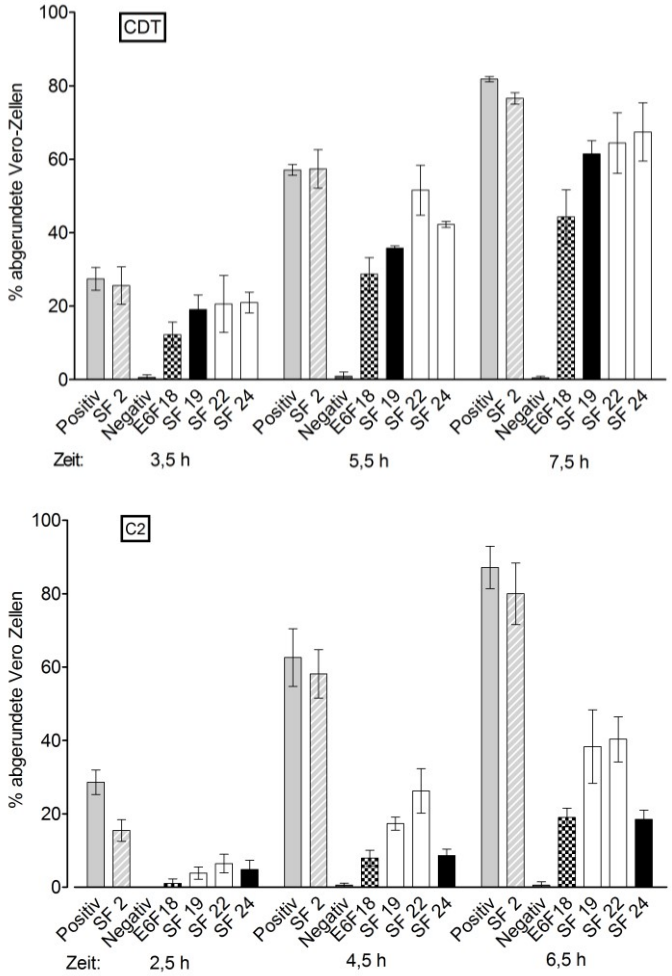



**Abb. 20: Quantitative Auswertung der Überprüfung relevanter Subfraktionen aus dem Primärscreening in Dreifachbestimmung mit den Toxinen CDT und C2**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung im zeitlichen Verlauf (CDT im oberen Bild: t=3,5 h, 5,5 h und 7,5 h; C2 im unteren Bild: t=2,5 h, 4,5 h und 6,5 h). Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die Toxinkonzentrationen betrugen für CDT 40/60 ng/mL und C2 250/500 ng/mL. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. E6F8.SF2 (grau-schraffiert) wurde als Peptidkontrolle mituntersucht. Die Ausgangsfraktion E6F18 ist schwarz-weiß kariert dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die Subfraktionen unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Abbildung 20 stellt in zwei Diagrammen den Vergiftungsverlauf mit beiden Toxinen dar. Die Beobachtungen aus dem Primärscreening konnten in der

Dreifachbestimmung wiederholt gezeigt werden. Die Aufreinigung von E6F18 wies auf beide Toxine einen potenten Hemmeffekt auf. Wie im Primärscreening bereits vermutet, schien sich dieser im Zuge der rechromatographischen Auftrennung auf mehrere Subfraktionen verteilt zu haben. Diejenige Subfraktion mit dem deutlichsten Hemmeffekt auf die Vergiftung von CDT war E6F18.SF19. Der Effekt äußerte sich nur schwach, jedoch über alle drei Zeitwerte stabil. Die beiden Subfraktionen 22 und 24 ließen ebenfalls eine tendenzielle Verzögerung auf die CDT-Vergiftung erkennen, jedoch in noch schwächerer Ausprägung als SF 19 und zeitweilig von der Positiv-Kontrolle nicht abgrenzbar. Der Hemmeffekt auf das C2-Toxin zeigte sich deutlicher. Alle drei untersuchten Subfraktionen demonstrierten eine klare Hemmwirkung. Wiederholt zeigte SF 24 die stärkste Verzögerung auf die C2-Vergiftung. Dieser Hemmeffekt war von vergleichbarer Stärke wie jener der Ausgangsfraktion E6F18. Die Peptidkontrolle E6F18.SF2 verlief unter CDT auf einem Niveau mit der Positiv-Kontrolle. Im C2-Versuch ließ sich vor allem in der Frühphase der Vergiftung eine Verzögerung unter Inkubation mit E6F18.SF2 feststellen. Möglicherweise liegt auch hier ein schwacher Hemmeffekt vor. Da im Primärscreening mit C2 nur jene Subfraktionen untersucht wurden, welche sich im CDT-Versuch auffällig erwiesen, sind hemmende Peptidfraktionen unter den übrigen Subfraktionen nicht auszuschließen.

### 3.3.2 Untersuchung der zweiten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT

Im Screening der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 mit CDT konnte der Hemmeffekt der Ausgangsfraktion wiederholt bestätigt und in den Subfraktionen weiterverfolgt werden. Augenscheinlich verteilte sich dieser über mehrere benachbarte Subfraktionen, wobei die stärkste Hemmwirkung von Subfraktion 19 auszugehen schien. Nach Überprüfung dieser Beobachtung wurde E6F18.SF19 einer erneuten rechromatographischen Auftrennung zugeführt.

Aus dieser RPC resultierten 40 Peptidfraktionen, von denen lediglich die „Subsubfraktionen“ (SSF) 10 bis 20 eine relevante Menge Peptidmaterial enthielten und der AG Barth zugestellt wurden. Um einer weiteren Abschwächung des

Hemmeffekts entgegenzuwirken, wurden diese elf Peptidfraktionen zu je 20 L HF-Äquivalent mit 133,3 µL $H_2O$ *bidest* gelöst und je 10 µL Peptidvolumen pro *Well* zugeführt. Daraus resultiert eine Peptid-Äquivalentkonzentration von c(P)=0,15 $\frac{L\,HF}{\mu L}$ und eine Peptidkonzentration im *Well* von c(W)=0,015 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$. Die Ausgangsfraktion E6F18.SF19 wurde als neue Aufreinigung im 20 L HF-Äquivalent bereitgestellt, in 100 µL gelöst und mit 10 µL pro *Well* vergleichend mituntersucht. Dies entspricht mit c(W)=0,02 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$ der doppelten Konzentration in welcher E6F18.SF19 im Screening der ersten Auftrennungsstufe untersucht wurde. Bei einer überschaubaren Anzahl an Proben (elf Fraktionen zzgl. der Ausgangsfraktion), konnte die Untersuchung direkt in Dreifachbestimmung durchgeführt werden. Ein Primärscreening durch Einzelbestimmung war so nicht notwendig. Die CDT-Konzentration betrug 35/70 ng/mL. Der Versuch erfolgte auf Vero-Zellen.

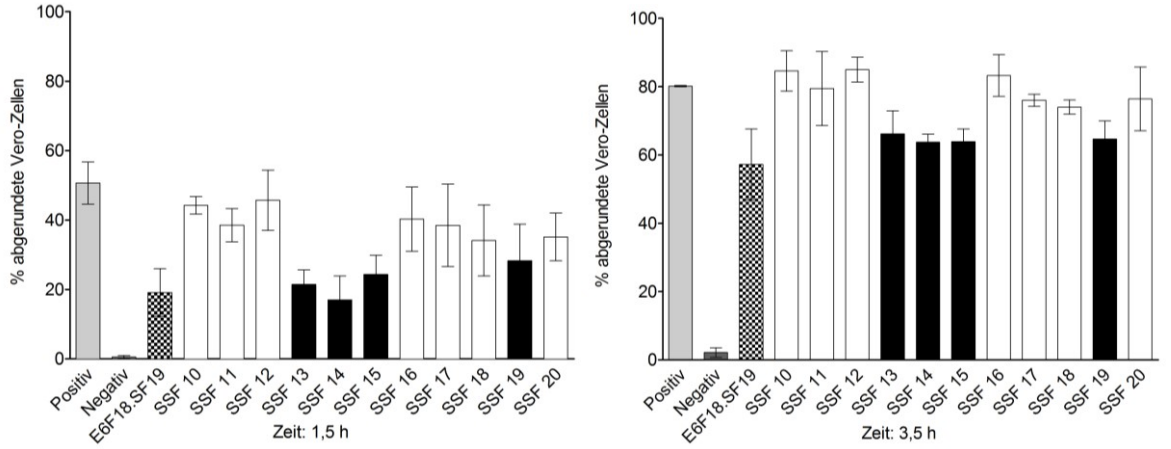



**Abb. 21: Quantitative Auswertung der Untersuchung von Fraktion 10-20 der zweiten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung zu den Zeitpunkten t=1,5 h und 3,5 h. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die CDT-Toxinkonzentration betrug 35/70 ng/mL. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Ausgangsfraktion E6F18.SF19 ist schwarz-weiß kariert dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind diejenigen SSF unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse des Screenings der zweiten Auftrennungsstufe von E6F18 in Dreifachbestimmung zu zwei Zeitpunkten dargestellt. Die Vergiftung

verlief rasch. Der Hemmeffekt der Ausgangsfraktion E6F18.SF19 konnte unter Erhöhung der Peptidkonzentration in vergleichbarer Hemmstärke zum Screening der ersten Auftrennungsstufe reproduziert werden. Auch unter den SSF konnte eine Hemmwirkung nachgewiesen werden. Dieser Hemmeffekt verteilte sich bei der Auftrennung zwar erneut über mehrere Peptidfraktionen, jedoch nicht in jenem Ausmaß, wie nach der ersten RPC beobachtet. Vor allem die vier SSF 13, 14, 15 und 19 zeigten eine deutliche Verzögerung der Vergiftungskinetik, auf etwa vergleichbarem Niveau wie die Ausgangsfraktion E6F18.SF19.

Die genannten vier „Subsubfraktionen“ wurden in einem weiteren Versuch erneut überprüft. Der Einsatz der Peptidfraktionen erfolgte analog zum Vorversuch. Die CDT-Konzentration betrug 35/70 ng/mL und die Vergiftung erfolgte mit Vero-Zellen.

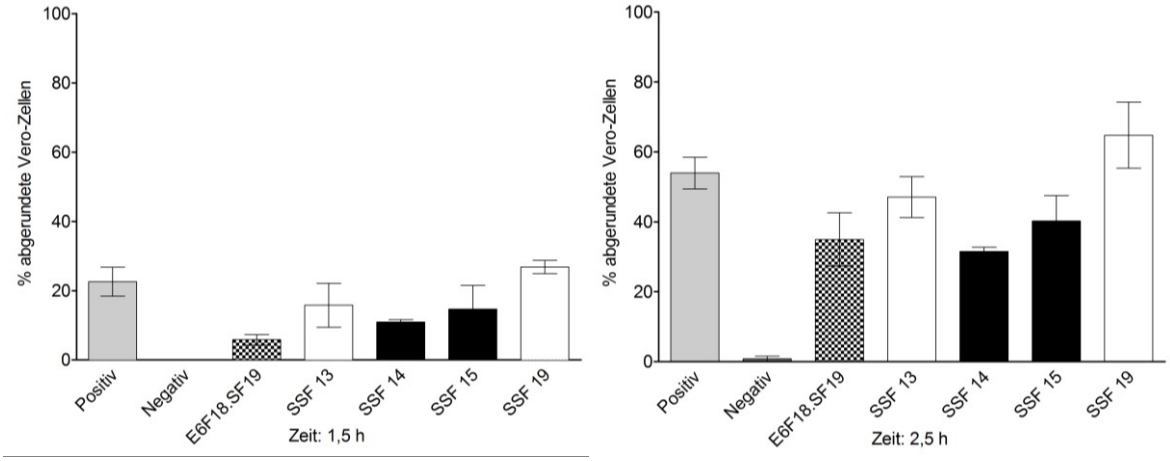



**Abb. 22: Quantitative Auswertung der Überprüfung der Trefferfraktionen aus dem Vorversuch mit CDT.**

Die Abbildung zeigt die quantitative Versuchsauswertung zu den Zeitpunkten t=1,5 h und 2,5 h. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die CDT-Toxinkonzentrationen betrug 35/70 ng/mL. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Die Ausgangsfraktion E6F18.SF19 ist schwarz-weiß kariert dargestellt. Schwarz hervorgehoben sind die SSF unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3).

Die in Abbildung 22 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen erneut eine rasche Vergiftungskinetik. Der zuvor gesehene Hemmeffekt erwies sich in diesem Versuch als schwächer. Lediglich die Ausgangsfraktion E6F18.SF19 sowie die beiden SSF 14 und 15 hoben sich von der Positiv-Kontrolle ab. SSF 13 lies allenfalls eine marginale Verzögerung der Vergiftung erkennen während SSF 19 keine

Unterscheidung zur Positiv-Kontrolle erlaubte. Es ist davon auszugehen, dass sich der schwach existierende Hemmeffekt vor allem auf die SSF 14 und ihre Nachbarfraktion 15 konzentriert.

### 3.3.3 Untersuchung der dritten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT

Auch in der Untersuchung der zweiten Auftrennungsstufe schien sich der Hemmeffekt der Ausgangsfraktion über mehrere Unterfraktionen verteilt zu haben. Es fanden sich die beiden Nachbarfraktionen E6F18.SF19.SSF14 und 15, welche den deutlichsten Hemmeffekt auf die Vergiftung mit CDT zeigten. Auch im von Herrn Dr. Ständker angefertigten Chromatogramm der zweiten RPC (nicht abgebildet) wurde ein Peak zwischen diesen beiden Nachbarfraktionen verzeichnet. Dies veranlasste dazu, die dritte RPC mit einem Pooling der beiden „Subsubfraktionen" von E6F18 durchzuführen, um nicht einen großen Teil des möglichen Zielpeptids zu verwerfen.

Aus der dritten RPC wurden die relevanten „Subsubsubfraktionen" (SSSF) 13 bis 23 im 20 L HF-Äquivalent bereitgestellt. Diese elf Proben wurden jeweils mit 100 µL $H_2O$ *bidest* in Lösung gebracht und mit jeweils 10 µL pro *Well* untersucht. Es errechnen sich eine Äquivalenzkonzentration von c(P)=0,2 $\frac{L\,HF}{\mu L}$ und eine Konzentration im *Well* c(W)=0,02 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$. Eine neue Ausgangsfraktion E6F18.SF19.SSF14+15 wurde nicht bereitgestellt. Das Screening mit den elf zu untersuchenden SSSF erfolgte abermals direkt in Dreifachbestimmung. Die Vergiftung erfolgte mit Vero-Zellen und einer CDT-Konzentration von 25/50ng/mL.

Abbildung 23 demonstriert die Ergebnisse des Screenings der dritten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823). Trotz erneuter Reduktion der Toxinkonzentration verlief auch dieser Vergiftungsversuch sehr rasch. Die quantitative Auswertung zeigt fast alle untersuchten Peptidfraktionen auf einem Niveau mit der Positiv-Kontrolle. Eine leichte Verzögerung der Vergiftungskinetik war unter Inkubation mit der SSSF 18 erkennbar. Dieser Effekt war schwach erkennbar, aber über alle dargestellten Zeitwerte stabil.

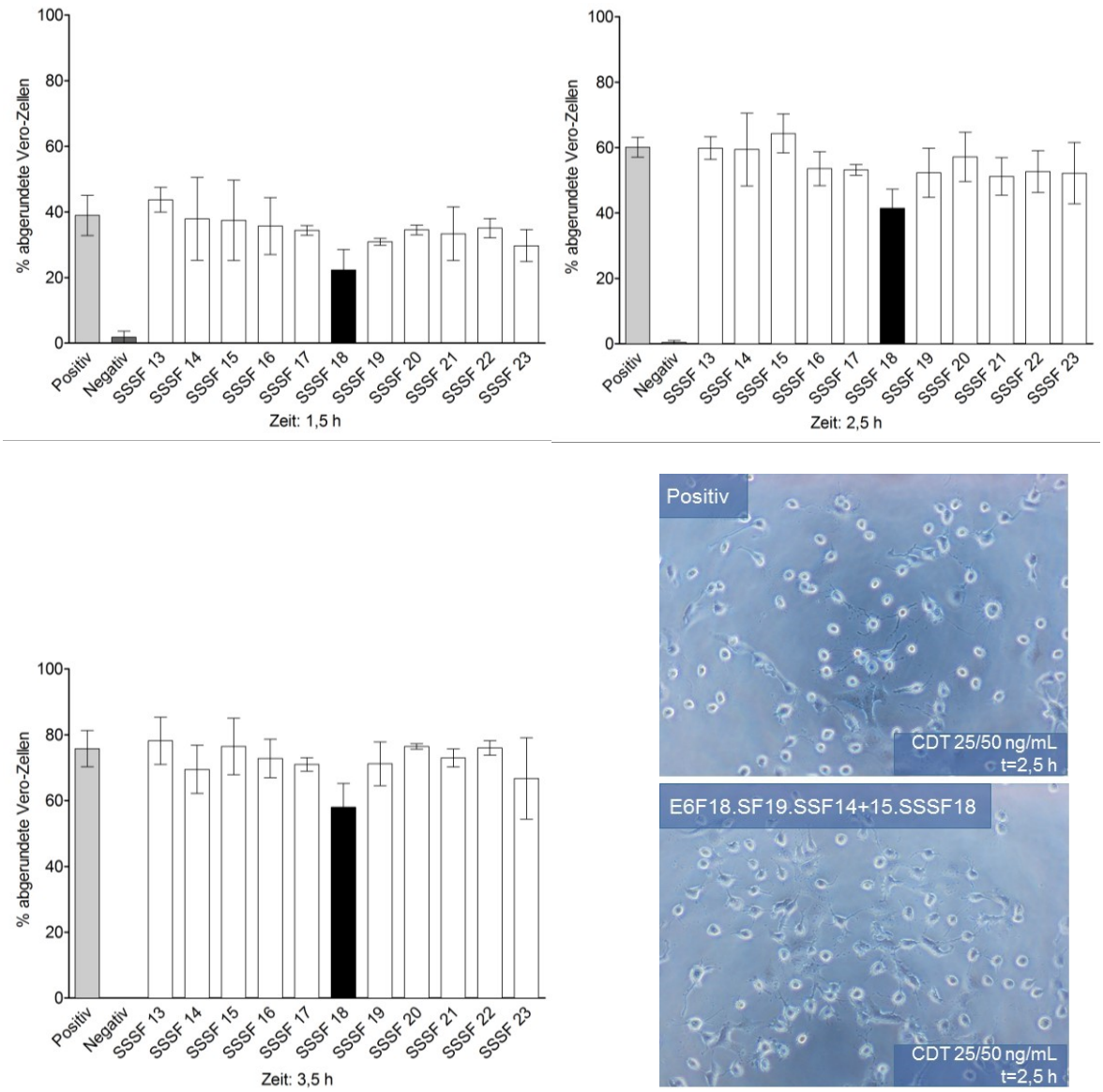



**Abb. 23: Auswertung der Untersuchung von Fraktion 13-23 der dritten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT.**

Die quantitative Versuchsauswertung zu den Zeitpunkten t=1,5 h, 2,5 h und 3,5 h ist in drei Balkendiagrammen dargestellt. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die CDT-Toxinkonzentrationen betrug 25/50 ng/mL. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Schwarz hervorgehoben ist SSSF 18 unter deren Inkubation die Zellvergiftung die deutlichste Verzögerung aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3). Im rechten unteren Bildabschnitt sind exemplarisch repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Positiv-Kontrolle und der auffälligen SSSF 18 bei 20 x Vergrößerung zum Zeitpunkt t=2,5 h dargestellt.

Zum qualitativen Vergleich wurde von der Positiv-Kontrolle und der auffälligen SSSF 18 jeweils eine lichtmikroskopische Aufnahme zum Zeitpunkt t=2,5 h abgebildet.

Der geringe Unterschied von knapp 20 Prozentpunkten aus der quantitativen Auswertung ist qualitativ nur unter genauer Betrachtung erkennbar. SSSF 23 zeigte im Vergleich ebenfalls eine schwache Verzögerung. Ein möglicher Hemmeffekt ist nicht sicher auszuschließen und sollte erneut überprüft werden.

Ob sich die ursprüngliche Hemmwirkung von E6F18 auf CDT im Zuge der drei rechromatographischen Auftrennungen ganz verloren hat oder eine restliche Hemmwirkung von der SSSF 18 ausgeht, sollte genau überprüft werden.

Hierfür wurde E6F18.SF19.SSF14+15.SSSF18 zusammen mit beiden Nachbarfraktionen, sowie SSSF 23 erneut untersucht. Als Peptidkontrolle, von welcher ausgehend keine Hemmwirkung zu erwarten war, wurde SSSF 15 gewählt. Um eine zu rasche Vergiftung zu vermeiden wurde die CDT-Toxinkonzentration weiter auf 20/40 ng/mL reduziert. Der übrige Versuchsaufbau wurde entsprechend des Vorversuchs durchgeführt.

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse bestätigen in ihrer Tendenz den im Vorversuch beschriebenen Hemmeffekt von E6F18.SF19.SSF14+15.SSSF18. Auch unter deutlich langsamerer Vergiftungskinetik war der Hemmeffekt nur sehr schwach ausgeprägt. Nach 24 h waren alle mit Toxin behandelten Zellen abgerundet (nicht abgebildet). Die exemplarischen lichtmikroskopischen Aufnahmen zum Zeitpunkt t=7 h lassen den qualitativen Unterschied zwischen der SSSF 18 und der Positiv-Kontrolle nur schwer erkennen. Die als Peptidkontrolle eingesetzte SSSF 15 ließ eine mit der Positiv-Kontrolle vergleichbare Vergiftungskinetik sehen. Die beiden Nachbarfraktionen von SSSF 18, sowie SSSF 23 zeigten keinen relevanten Hemmeffekt.

Die hemmende SSSF 18 entspricht dem Peak im Chromatogramm der dritten RPC (nicht abgebildet). Nach Angaben von Herrn Dr. Ständker sind Peptide in diesem Bereich nun soweit abgrenzbar, dass im nächsten Schritt eine massenspektrometrische Isolierung durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) durchzuführen sei.

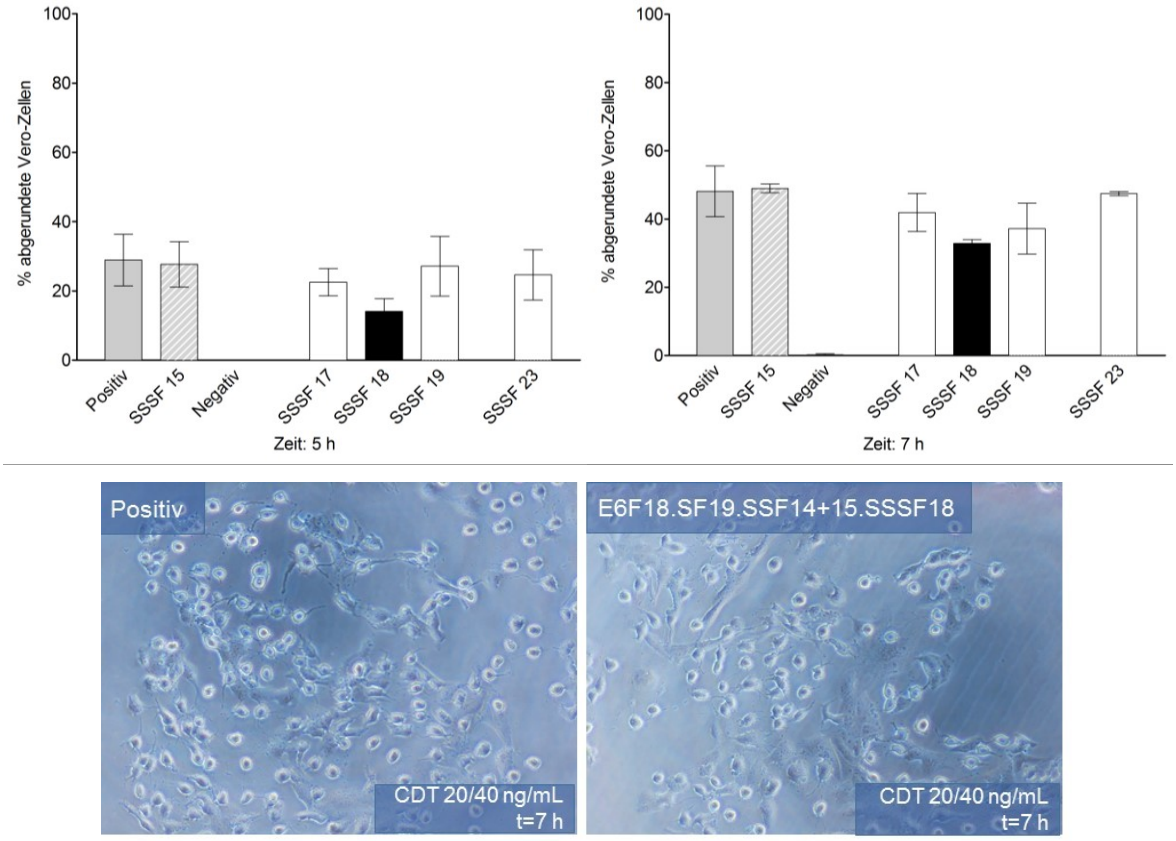



**Abb. 24: Auswertung der Überprüfung auffälliger Fraktionen aus dem ersten Screening der dritten Auftrennungsstufe von E6F18 (Charge 040823) mit CDT.**

Die quantitative Versuchsauswertung zu den Zeitpunkten t=5 h und 7 h ist in Balkendiagrammen dargestellt. Die Y-Achse zeigt den Anteil abgerundeter Vero-Zellen. Die CDT-Toxinkonzentrationen betrug 20/40 ng/mL. Die Balken der Positiv-/Negativ-Kontrolle sind in hell-/dunkelgrau dargestellt. Schwarz hervorgehoben ist SSSF 18, welche bereits im Vorversuch die deutlichste Verzögerung aufwies. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=3). Im unteren Bildabschnitt sind exemplarisch repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Positiv-Kontrolle und der auffälligsten Fraktion E6F18.SF19.SSF14+15.SSSF18 bei 20 x Vergrößerung zum Zeitpunkt t=7 h dargestellt.

Aus diesen Versuchen lässt sich feststellen, dass der Hemmeffekt von E6F18 (Charge 040823) auf das Toxin CDT über drei rechromatographische Auftrennungszyklen verfolgt werden konnte. Mit jeder weiteren Auftrennung verlor die Ausgangsfraktion einen Teil ihrer Hemmstärke. Insbesondere nach der ersten rechromatographsichen Auftrennung schien sich das Zielpeptid über einige Nachbarfraktionen verteilt zu haben und konsekutiv seine Hemmwirkung zu verlieren. Nach der dritten RPC war der Hemmeffekt nur noch schwach nachweisbar und ohne quantitative Auszählung kaum von der unbehandelten

Positiv-Kontrolle abzugrenzen. Ist die einstige, potente Hemmwirkung von E6F18 einem bestimmten Zielpeptid zuzuschreiben, so ist dieses am wahrscheinlichsten in der Fraktion E6F18.SF19.SSF14+15.SSSF18 zu lokalisieren. Diese Fraktion korrespondiert mit einem Peak im Chromatogramm der dritten RPC und ermöglicht gegebenenfalls eine Isolierung des Zielpeptids per MALDI-MS. Versuche mit dem verwandten C2-Toxin zeigen ähnliche Ergebnisse mit deutlich potenterer Hemmwirkung. Vergleichende Untersuchungen der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 mit den beiden Toxinen CDT und C2 liefern ähnliche Trefferfraktionen mit unterschiedlicher Präferenz. Ob sich hinter dem gemeinsamen Hemmeffekt von E6F18 auf die beiden Toxine ein identisches oder ein strukturell sehr ähnliches Zielpeptid verbirgt bleibt offen.

## 3.4 Analyse des Hemmmechanismus von E6F18 (Charge 040823)

Noch vor der Isolierung eines einzelnen Peptids wurden Versuche zur näheren Bestimmung des Mechanismus der Hemmwirkung von E6F18 (Charge 040823) durchgeführt. Aus den bereitgestellten Aufreinigungen der Ausgangsfraktion in höheren Maßstäben stand ausreichend Probevolumen für die mitunter aufwändigen Versuche zur Verfügung.

### 3.4.1 *In vitro* ADP-Ribosylierungsversuche mit E6F18 (Charge 040823) und CDT

Die *in vitro* Bestimmung der Enzymaktivität von CDT in An- und Abwesenheit der hemmenden Peptidfraktion E6F18 erfolgte zur näheren Eingrenzung des Hemmmechanismus. So sollte überprüft werden, ob der von E6F18 ausgehende Hemmeffekt über eine Inhibition der enzymatischen Toxinaktivität vermittelt wird. In vorangegangenen Untersuchungen konnte E6F18 bereits als Peptidfraktion mit unspezifischem Hemmeffekt gegenüber unterschiedlichen Toxinen identifiziert werden. Während der zytopathogene Effekt der binären Toxine CDT und C2 durch ADP-Ribosylierung von G-Aktin vermittelt wird, agiert das einkettige Toxin A durch Glykosylierung von Rho-Proteinen. Es erschien sinnvoll zu überprüfen, ob der toxin-

unspezifische Hemmeffekt über eine Inhibition der teilweise unterschiedlichen Enzymaktivität erzeugt werden kann.

Der Versuch erfolgte gemäß Abschnitt 2.2.4–2.2.7 durch Herstellung von Vero-Zelllysat, welches im Western-Blot-Verfahren analysiert wurde.

Die nach Bradford photometrisch bestimmte Proteinkonzentration des angefertigten Vero-Zelllysats betrug 4,45 µg/µL. Bei einem Volumen von 9 µL pro Ansatz ergibt sich ein Proteingehalt von etwa 40 µg. CDTa wurde pro Ansatz mit 20 ng bzw. 100 ng vergleichend eingesetzt. Als dritte Positiv-Kontrolle wurde C2I mit 1 ng pro Ansatz ohne korrespondierende Peptidinkubation mituntersucht. Eine Aufreinigung von E6F18 im 33 L HF-Äquivalent wurde mit 600 µL $H_2O$ *bidest* gelöst. Je 2,5 µL der Peptidlösung wurden pro Ansatz verwendet. Die Versuchsanordnung lässt sich dem Pipettierschema in Tabelle 13 entnehmen.

**Tabelle 13:** Pipettierschema für die *in vitro* Bestimmung der Enzymaktivität von CDT in An- und Abwesenheit von E6F18

| | Positiv 1 | Positiv 2 | Positiv 3 | Negativ | Probe 1 | Probe 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vero-Lysat [µL] | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| CDTa [ng] | 20 | 100 | | | 20 | 100 |
| C2I [ng] | | | 1 | | | |
| E6F18 [µL] | | | | | 2,5 | 2,5 |
| Biotin-NAD [µL] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ADP-Ribosylierungspuffer [µL] | 12,3 | 12,4 | 13,3 | 15 | 9,8 | 9,9 |
| Gesamtvolumen [µL] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

Nach Vergiftungsbeginn erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Die übrigen Arbeitsschritte entsprachen der Beschreibung aus den Abschnitten 2.2.4 – 2.2.7.

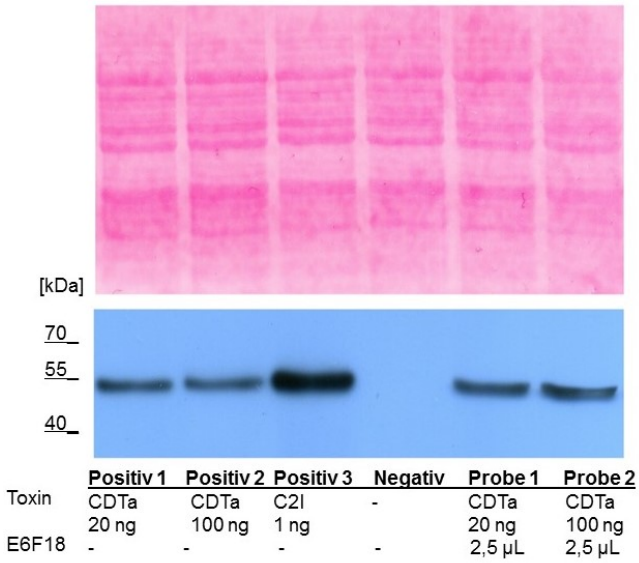



**Abb. 25: Resultat der *in vitro* Bestimmung der Enzymaktivität von CDT in An- und Abwesenheit von E6F18**

Die Toxinkonzentration betrug für CDT 20 bzw. 100 ng, für C2 100 ng pro Ansatz. Die beiden Proben enthielten 2,5 µL Peptidlösung. Die Konzentration des Vero-Zelllysats betrug 40 µg pro Ansatz. Jeder Ansatz enthielt 1 µL biotinyliertes NAD+. Im oberen Bildabschnitt ist die Nitrozellulosemembran mit unspezifischer Bandenfärbung nach Ponceau S zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinauftrennung und -übertragung mittels SDS-Page und Western-Blot dargestellt. Die untere Abbildung zeigt den entwickelten Film nach Detektion des Biotin-markierten, ADP-ribosylierten Aktins mittels Strep-POD (1:2500). Die ersten beiden Positiv-Kontrollen (Positiv 1 & 2) korrespondieren mit den peptidbehandelten Proben (Probe 1 & 2). Die C2I behandelte Kontrolle (Positiv 3) sowie die Negativ-Kontrolle (Negativ) dienen zur Überprüfung des korrekten Versuchsablaufs. Am linken Bildrand wurden die Marker-Banden übertragen und das entsprechende Molekulargewicht in [kDa] angegeben.

Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Nitrozellulosemembran nach Ponceau S-Färbung zeigt mit einer homogenen Proteinbandenverteilung die vergleichbare Beladung der Ansätze mit Zell-Lysat und eine erfolgreiche gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Übertragung auf die Membran. Der untere Bildabschnitt demonstriert den entwickelten Film nach Detektion des ADP-ribosylierten Aktins. Unter Zuhilfenahme der eingezeichneten Markerbanden lässt sich die Molekülmasse der detektierten Banden bei ca. 50-55 kDa lokalisieren. Der leichte Unterschied zur erwarteten Molekülmasse von G-Aktin bei 40-45 kDa lässt sich am ehesten mit der ungleichmäßigen Laufgeschwindigkeit der randständig aufgetragenen Proteinbanden im Gel während der Elektrophorese

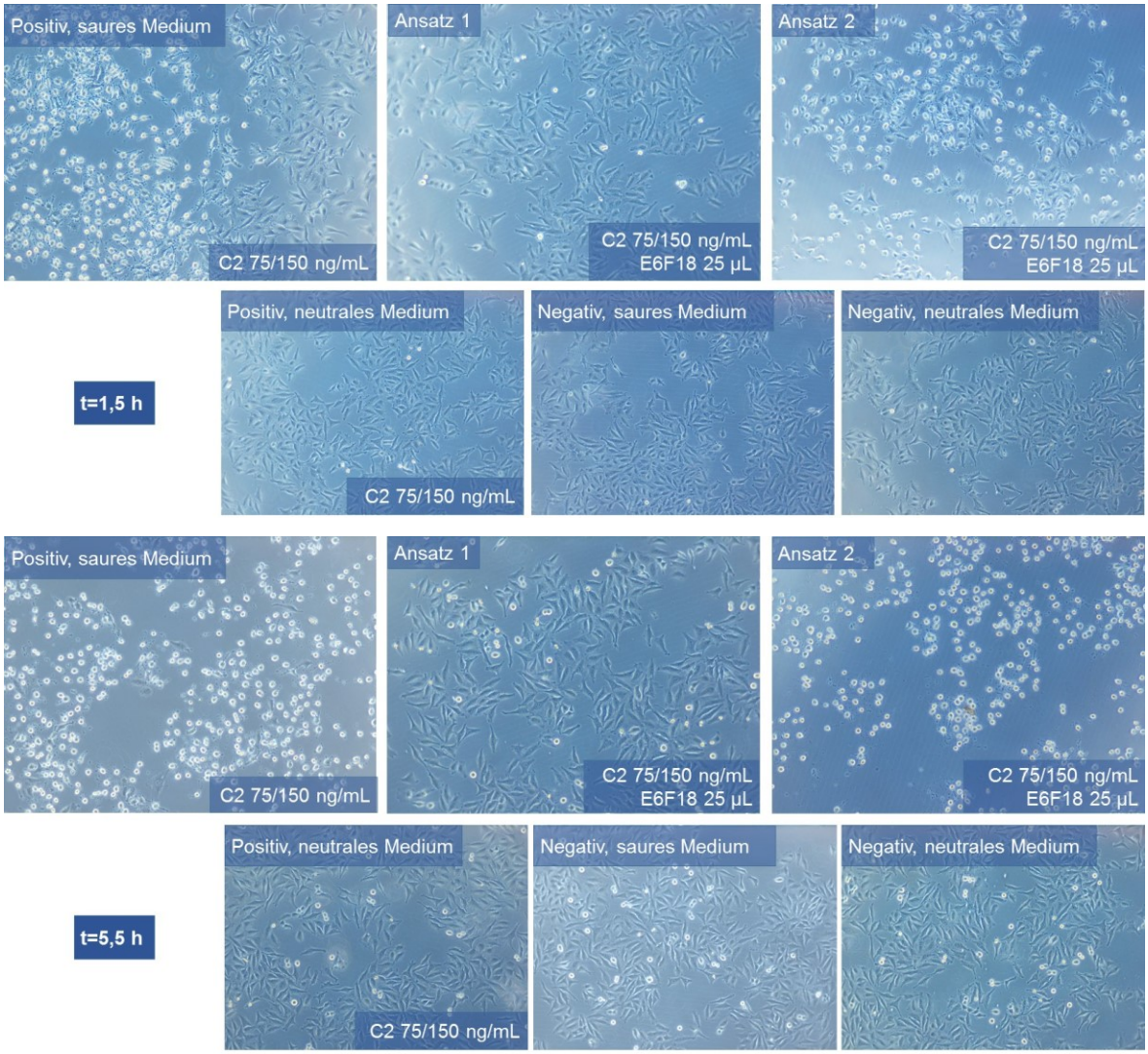
erklären. Es ist erkennbar, dass während der 15-minütigen Inkubationszeit im zur Kontrolle verwendeten C2I-Ansatz deutlich mehr enzymatischer Substratumsatz stattfand als in den CDTa-behandelten Ansätzen. Zwischen den beiden CDTa-Konzentrationen hingegen ist kein Unterschied sichtbar. Entscheidend ist der Bandenvergleich der CDTa-behandelten Positiv-Kontrollen (Positiv 1 & 2) mit den beiden Proben. Hinsichtlich der Bandenintensität ist keine Unterscheidung zwischen peptidbehandelten Proben und der Positiv-Kontrolle möglich. Diese Beobachtung spricht für eine adäquate *in vitro* ADP-Ribosylierung in allen CDTa-behandelten Ansätzen. Der Vergleich zur C2-Kontrolle demonstriert, dass es unter den CDTa-behandelten Ansätzen während der Inkubationszeit nicht zum vollständigen Substratumsatz gekommen ist. Auch ein schwacher Hemmeffekt während der Frühphase der Vergiftung wäre somit erkennbar gewesen. Eine Vermittlung des Hemmeffekts von E6F18 durch Inhibition der enzymatischen Aktivität von CDT ist folglich unwahrscheinlich.

### 3.4.2 Toxin-Translokationsversuche mit E6F18 und dem C2-Toxin

Nach Ausschluss einer hemmenden Interaktion von E6F18 mit der katalytischen Toxindomäne CDTa, verblieben etliche weitere potentielle Ansatzstellen, die es zu untersuchen galt. Der Toxin-Translokationsversuch stellte ein hervorragendes Instrument zur weiteren Eingrenzung des zu Grunde liegenden Hemmmechanismus dar. Da sich die Methodik als aufwändig und störungsanfällig herausstellte, wurde der Versuch mit dem methodisch besser etablierten und CDT-verwandten C2-Toxin auf HeLa-Zellen durchgeführt. Eine Übertragung der so gewonnenen Erkenntnisse auf CDT ist selbstverständlich nur unter gewissem Vorbehalt möglich.

Zum genauen Verständnis der etwas komplexeren Versuchsdurchführung wird auf die detaillierte Beschreibung in Abschnitt 2.2.8 verwiesen. HeLa-Zellen wurden auf einer 24-*Well* Mikrotiterplatte über zwei Tage ausgesät. Die C2-Konzentration betrug 75/150 ng/mL. E6F18 (Charge 040823) im 10 L HF-Äquivalent wurde in 200 µL $H_2O$ *bidest* gelöst und jeweils 25 µL pro 250 µL-Ansatz verwendet. Dies entspricht einer c(P)=0,05 $\frac{L\,HF}{\mu L}$ und einer c(W)=0,005 $\frac{\frac{L\,HF}{\mu L}}{\mu L}$. Alle Zellkammern wurden

mit Bafilomycin A1 in 200 nM für 30 min bei 37 °C inkubiert. Wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben, wurden zwei unterschiedliche Peptid-Ansätze vorbereitet. Während die Peptidlösung in Ansatz 1 gemeinsam mit dem Toxin noch vor dem Ansäuern auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert wurde, kam die Peptidlösung in Ansatz 2 erst nach Toxinbindung gemeinsam mit dem sauren Medium auf die Zellen. Jeweils eine Positiv- und Negativ-Kontrolle (mit und ohne Toxin) wurde vergleichend mit den beiden Ansätzen dem gesamten Procedere unterzogen. Um eine unbeabsichtigte Vergiftung aufgrund insuffizienter Blockade der konventionellen, endosomalen Toxinprozessierung auszuschließen, erhielt ein zusätzliches Kontrollpaar zum Zeitpunkt des Mediumwechsels neutrales an Stelle des sauren Mediums.



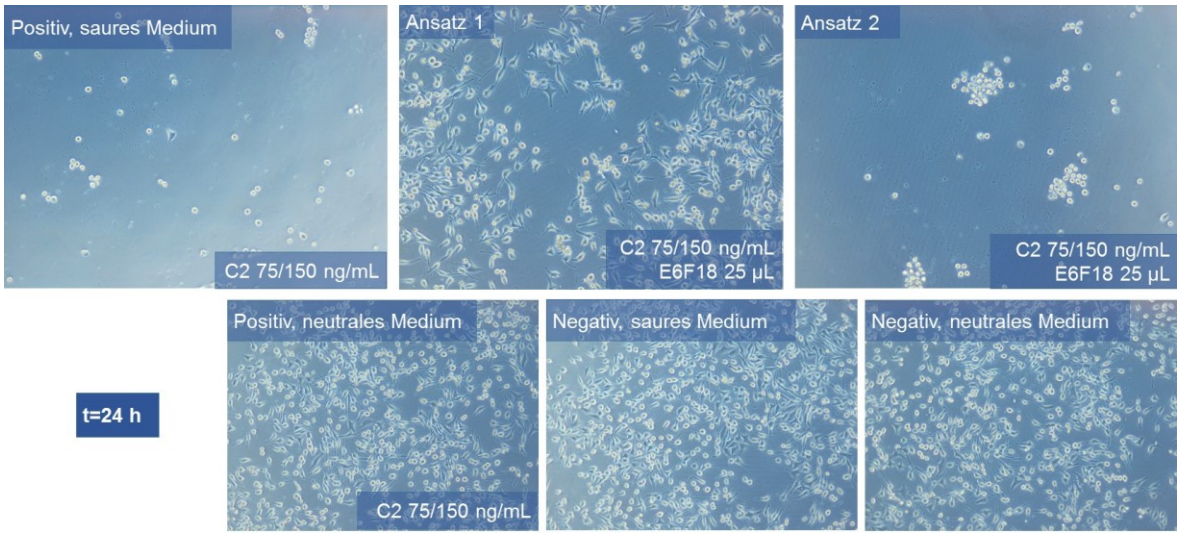



**Abb. 26: Qualitative Übersicht des Toxin-Translokationsversuchs mit E6F18 und dem C2-Toxin.**

Drei Darstellungen dokumentieren den Verlauf des Toxin-Translokationsversuchs auf HeLa-Zellen zu den exemplarischen Zeitwerten t=1,5 h (oben), 5,5 h (mittig) und 24 h (unten). Die C2-Konzentration betrug 75/150 ng/mL. Alle Zellkammern wurden mit Bafilomycin A1 in 200 nM für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Ansatz 1 erhielt 25 µL der Peptidlösung E6F18 simultan mit der Toxingabe zur 10-minütigen Inkubation auf Eis, während die Verabreichung derselben Peptidmenge in Ansatz 2 zusammen mit dem sauren Medium erfolgte. Eine Positiv-Kontrolle (Positiv, saures Medium) diente der Überprüfung einer regelrechten artifiziellen Toxintranslokation. Drei Negativ-Kontrollen (Positiv, neutrales Medium; Negativ, saures Medium und Negativ, neutrales Medium) sollten keine Vergiftungserscheinungen zeigen und sind auf den drei Darstellungen jeweils verkleinert im rechten unteren Bildabschnitt lokalisiert. Die Aufnahmen erfolgten bei 10 x Vergrößerung.

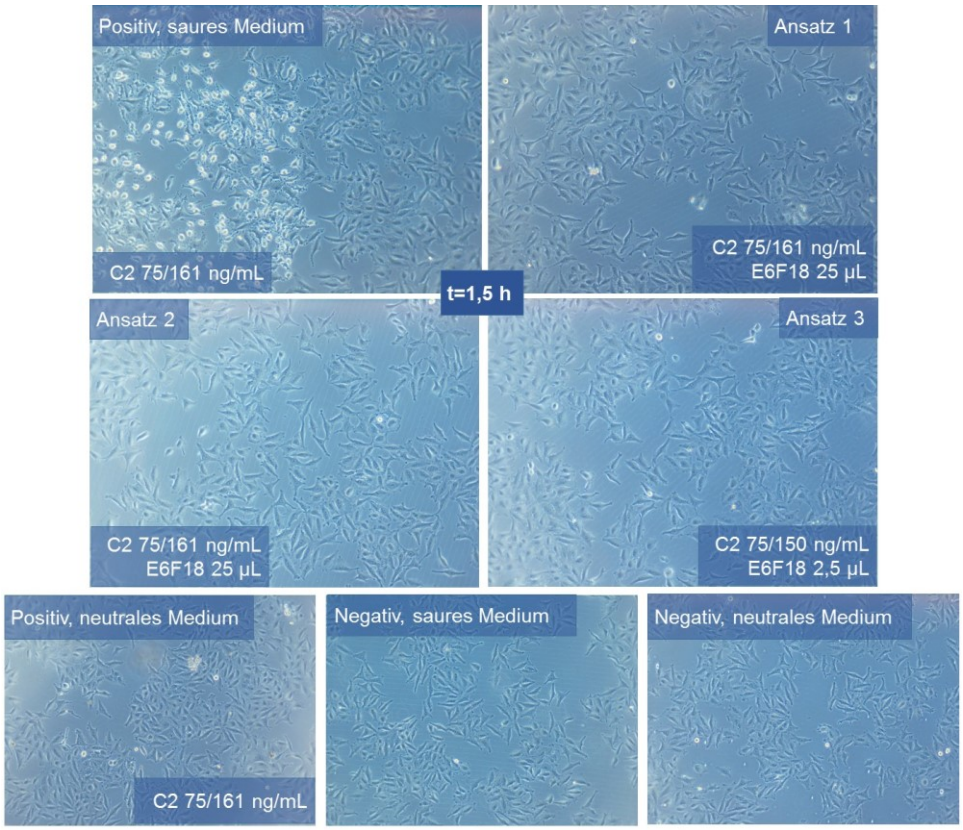
Abbildung 26 zeigt die qualitative Auswertung des Toxin-Translokationsversuchs mit E6F18 und dem C2-Toxin auf HeLa-Zellen zu drei exemplarischen Zeitwerten. Vor allem zu Beginn der Vergiftungsphase (t=1,5 h) imponierte ein inhomogenes Vergiftungsbild, das sich von der linken Bildhälfte nach rechts ausbreitete. Der Grund hierfür konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die drastischen Unterschiede zwischen den behandelten Zellkammern sind in den lichtmikroskopischen Aufnahmen eindrücklich erkennbar. Von einer quantitativen Auszählung wurde daher abgesehen.

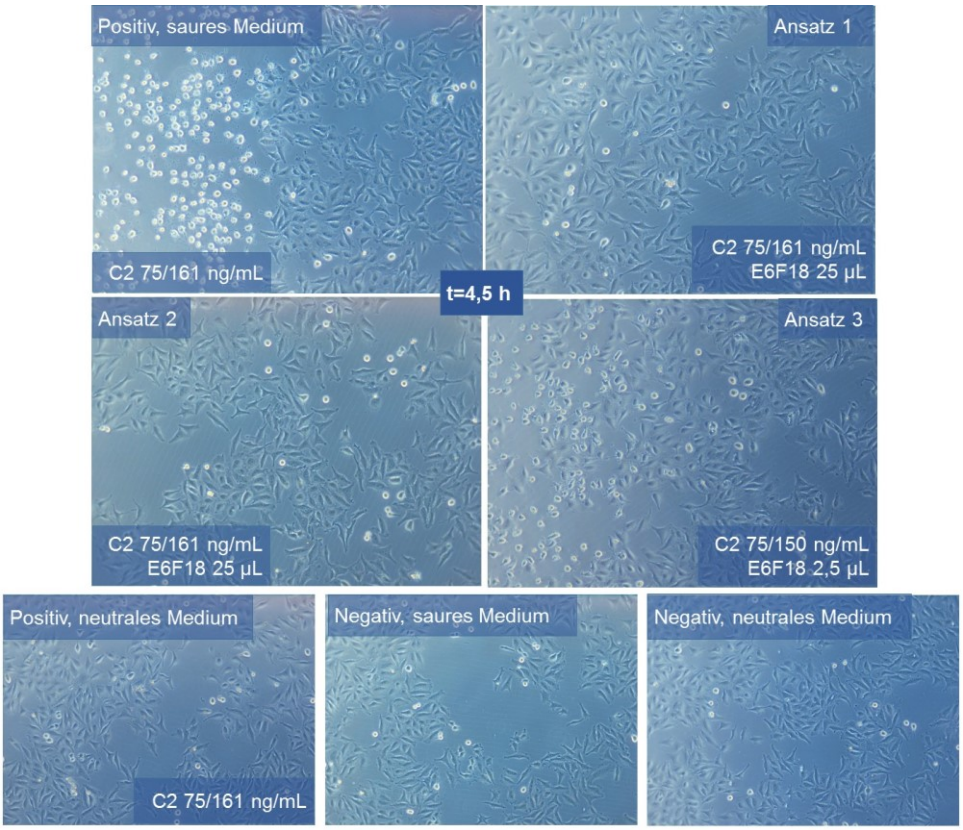
Der Versuch verlief erwartungsgemäß. Die Vergiftung durch artifizielle Toxin-Translokation startete in der Positiv-Kontrolle (Positiv, saures Medium) zügig und erreichte rasch die vollständige Abrundung aller Zellen. Die Negativ-Kontrollen (Positiv, neutrales Medium; Negativ, saures Medium und Negativ, neutrales

Medium) zeigten keinerlei Vergiftungszeichen. Eine konventionelle Vergiftung konnte erfolgreich verhindert werden. Nach 24 h stellte sich in allen beobachteten Zellkammern eine unspezifische zellmorphologische Veränderung ein, die folglich am ehesten mit einem Bafilomycin A1-induzierten Eigeneffekt zu erklären ist. Die beiden peptidbehandelten Ansätze 1 & 2 lieferten diametral entgegengesetzte Befunde. Während Ansatz 1 einen sehr potenten Hemmeffekt erkennen ließ, welcher sich nach 1,5 h nicht von den Negativ-Kontrollen unterschied und auch nach 5,5 h nur minimale Vergiftungszeichen verzeichnete, lieferte Ansatz 2 einen mit der Positiv-Kontrolle vergleichbaren Vergiftungsverlauf. Selbst nach 24 h waren in Ansatz 1 noch nicht-vergiftete Zellen erkennbar, soweit die allgemeinen Zellveränderungen zu diesem Zeitpunkt eine Beurteilung zulassen.

Unter Zuhilfenahme der in Abschnitt 2.2.8 angestellten Vorüberlegungen liefern diese Beobachtungen einen starken Hinweis auf den möglichen Hemmmechanismus. Ein derartig starker Hemmeffekt in Ansatz 1 unter Ausbleiben der Hemmung in Ansatz 2 legen die Vermutung nahe, dass die Hemmwirkung von E6F18 auf das C2-Toxin zeitlich noch vor der endozytotischen Toxinaufnahme und anschließender Translokation erfolgt.

Zur Bestätigung der Beobachtungen und genaueren Charakterisierung des Hemmeffektes bei artifizieller Toxin-Translokation, wurde der Versuch unter geringen Modifikationen wiederholt. Um den gesehenen Hemmeffekt in Ansatz 1 aus dem Vorversuch zu bestätigen wurde dieser in zweifacher Bestimmung (Ansatz 1 & 2) erneut untersucht. Vergleichend wurde in Ansatz 3 bei reduzierter Peptidkonzentration dieselbe Versuchsdurchführung gewählt. So erhielten Ansatz 1 & 2 jeweils 25 µL Peptidlösung (c(W)=0,005 $\frac{\frac{LHF}{\mu L}}{\mu L}$), während Ansatz 3 lediglich mit 2,5 µL (c(W)=0,0005 $\frac{\frac{LHF}{\mu L}}{\mu L}$) behandelt wurde. In allen drei Ansätzen wurde die Peptidlösung simultan zur Toxingabe verabreicht. Aufgrund möglicher Eigeneffekte wurde die Bafilomycin A1 Konzentration auf 100 nM reduziert. Die C2-Konzentration betrug 75/161 ng/mL. Der übrige Versuchsablauf entsprach dem Vorversuch.


Positiv, saures Medium
C2 75/161 ng/mL
Ansatz 1
C2 75/161 ng/mL
E6F18 25 µL
t=1,5 h
Ansatz 2
C2 75/161 ng/mL
E6F18 25 µL
Ansatz 3
C2 75/150 ng/mL
E6F18 2,5 µL
Positiv, neutrales Medium
C2 75/161 ng/mL
Negativ, saures Medium
Negativ, neutrales Medium


Positiv, saures Medium
C2 75/161 ng/mL
Ansatz 1
C2 75/161 ng/mL
E6F18 25 µL
t=4,5 h
Ansatz 2
C2 75/161 ng/mL
E6F18 25 µL
Ansatz 3
C2 75/150 ng/mL
E6F18 2,5 µL
Positiv, neutrales Medium
C2 75/161 ng/mL
Negativ, saures Medium
Negativ, neutrales Medium

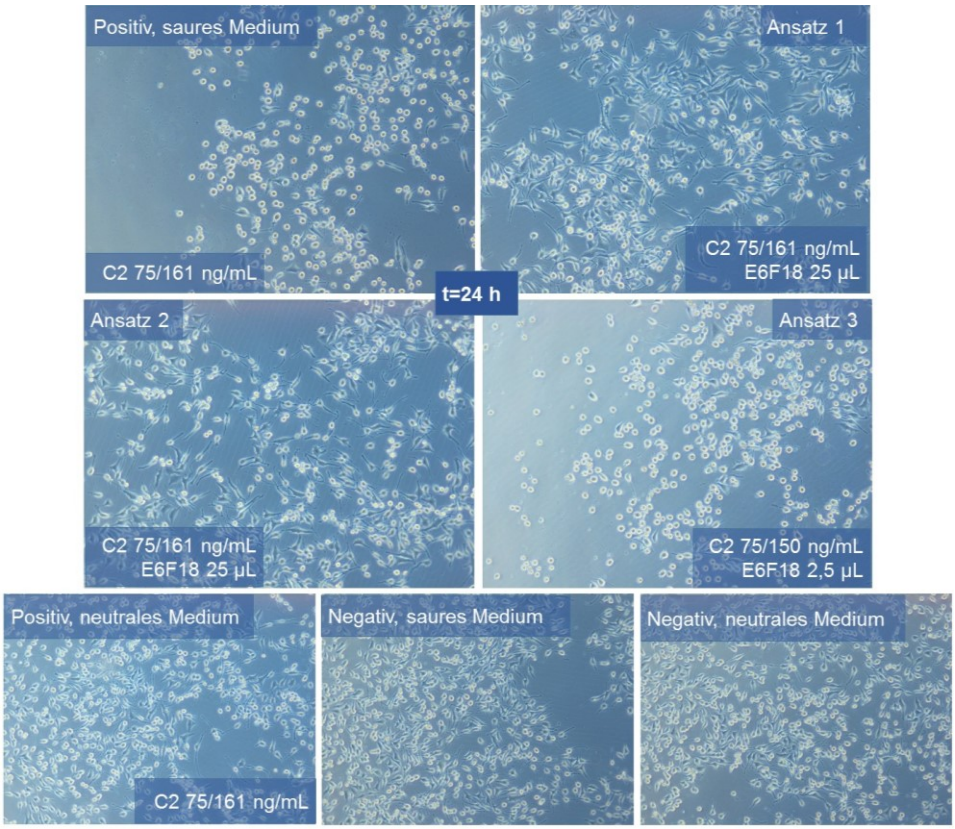



**Abb. 27: Qualitative Übersicht des Toxin-Translokationsversuchs mit E6F18 und dem C2-Toxin.**

Drei Darstellungen dokumentieren den Verlauf des Toxin-Translokationsversuchs auf HeLa-Zellen zu den exemplarischen Zeitwerten t=1,5 h (oben), 4,5 h (mitte) und 24 h (unten). Die C2-Konzentration betrug 75/161 ng/mL. Alle Zellkammern wurden mit Bafilomycin A1 in 100 nM für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Ansatz 1 & 2 erhielten 25 µL, Ansatz 3 2,5 µL der Peptidlösung E6F18 simultan mit der Toxingabe zur 10-minütigen Inkubation auf Eis. Eine Positiv-Kontrolle (Positiv, saures Medium) diente der Überprüfung einer regelrechten artifiziellen Toxin-Translokation. Drei Negativ-Kontrollen (Positiv, neutrales Medium; Negativ, saures Medium und Negativ, neutrales Medium) sollten keine Vergiftungserscheinungen zeigen und sind auf den drei Darstellungen jeweils verkleinert im unteren Bildabschnitt lokalisiert. Die Aufnahmen erfolgten bei 10 x Vergrößerung.

Die Ergebnisse des zweiten Toxin-Translokationsversuchs mit E6F18 und dem C2-Toxin sind in Abbildung 27 anhand drei exemplarischer Zeitwerte dargestellt. Trotz mehrfachem Schwenken der Mikrotiterplatte nach Toxinübertragung und Gabe beider Toxinkomponenten in jeweils unterschiedliche Bereiche der Zellkammern, zeigte sich erneut ein inhomogenes Vergiftungsmuster. Die Negativ-Kontrollen (Positiv, neutrales Medium; Negativ, saures Medium und Negativ, neutrales Medium) zeigten keine Vergiftungszeichen. Auch unter reduzierter Bafilomycin A1-

Konzentration konnte eine suffiziente Blockade der endosomalen v-ATPase ermöglicht werden. Dennoch stellten sich nach 24 h abermals die zuvor beschriebenen Zellveränderungen ein. Dessen ungeachtet zeigten sich erneut deutliche Unterschiede, die sich in den lichtmikroskopischen Aufnahmen klar darstellen. Der Hemmeffekt unter Ansatz 1 im Vorversuch konnte in beiden gleich behandelten Ansätzen 1 & 2 bestätigt werden. Bei gleichzeitiger Inkubation von E6F18 in c(W)=0,005 $\frac{\frac{LHF}{\mu L}}{\mu L}$ mit dem C2-Toxin auf Eis konnte eine Vergiftung der HeLa-Zellen über 24 h nahezu komplett verhindert werden. Auch bei reduzierter Peptidkonzentration in Ansatz 3 konnte ein potenter Hemmeffekt festgestellt werden. Eine Differenzierung der Hemmstärke von den höher konzentrierten Ansätzen 1 & 2 war interessanterweise erst im zeitlichen Verlauf möglich. Zum Zeitpunkt t=1,5 h demonstrierte auch Ansatz 3 eine komplette Hemmung der Vergiftung. Nach 4,5 h waren erste Unterschiede hinsichtlich der Hemmstärke erkennbar. Während Ansatz 1 & 2 nach wie vor keine Unterscheidung zu den Negativ-Kontrollen zuließen, zeigte Ansatz 3, in der linken Bildhälfte beginnend, erste zellmorphologische Vergiftungserscheinungen. Zum letzten Beobachtungszeitpunkt nach 24 h waren zwischen Ansatz 3 und der Positiv-Kontrolle (Positiv, saures Medium) keine Unterschiede erkennbar.

Die Ergebnisse des zweiten Toxin-Translokationsversuchs untermauern die Beobachtungen des Vorversuchs und weisen bei simultaner Verabreichung auf eine potente Hemmwirkung von E6F18 (Charge 040823) auf das C2-Toxin hin. Bei ausreichend hoher Peptidkonzentration (hier c(W)=0,05 $\frac{\frac{LHF}{\mu L}}{\mu L}$) konnte eine Zellvergiftung sogar gänzlich verhindert werden. Eine derartig vollständige Hemmung konnte bei konventionellen Vergiftungsversuchen bislang nicht beobachtet werden. Grundvoraussetzung für einen solch starken Hemmeffekt scheinen also interessanterweise nicht nur der besondere Versuchsablauf mit artifizieller Toxin-Translokation, sondern auch die gewählte Konzentration der Peptidlösung, so wie die Eigenheiten des jeweiligen Toxins zu sein.

## 3.5 Untersuchung von E6F18 auf adverse Eigeneffekte auf Vero-Zellen

Abschließend sollten mögliche zytotoxische Eigeneffekte der Peptidfraktion E6F18 (Charge 040823) ausgeschlossen werden. Vergleichend mit zwei unbehandelten Negativ-Kontrollen, wurden zwei Zellkammern mit jeweils 10 µL Peptidlösung aus verschiedenen Aufreinigungen der Peptidfraktion E6F18 behandelt. Eingesetzt wurden die im Zuge der ersten RPC bereitgestellten Aliquots der Ausgangsfraktion E6F18. Diese beiden Aliquots lagen im 10 L HF-Äquivalent vor und wurden mit 200 µL $H_2O$ *bidest* gelöst. Die Inkubation der Vero-Zellen erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % $CO_2$ unter serumfreiem Medium.

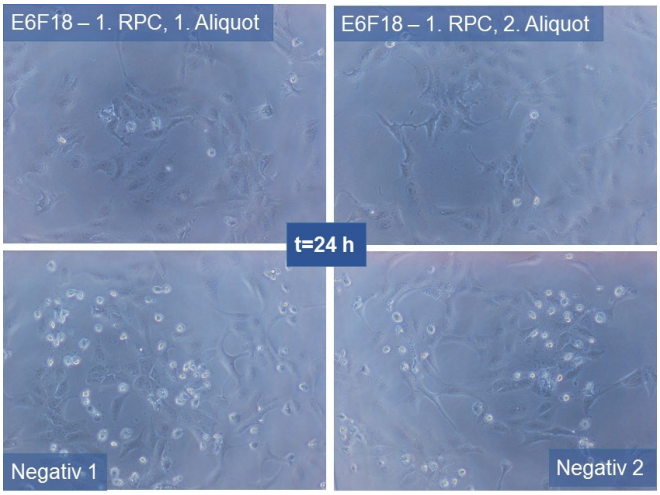



**Abb. 28: Qualitative Übersicht der Überprüfung von E6F18 auf adverse Eigeneffekte.**

Zur Untersuchung der Peptidfraktion E6F18 auf adverse Eigeneffekte erfolgte eine vergleichende Inkubation von Vero-Zellen mit zwei separaten Aliquots der Ausgangsfraktion E6F18 aus der ersten rechromatographischen Auftrennung (1. RPC, 1./2. Aliquot) gegenüber zwei Negativ-Kontrollen, welche lediglich mit serumfreiem Medium versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % $CO_2$. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten zum Zeitpunkt t=24 h bei 20 x Vergrößerung.

Eine Übersicht des Versuchs nach 24 h ist in Abbildung 28 dargestellt. Die gleich behandelten Zellkammern zeigen jeweils untereinander vergleichbare Resultate. In den peptidbehandelten Zellkammern waren nach 24 h weniger Zellen abgerundet, als in den Negativ-Kontrollen. Ein zytotoxischer Eigeneffekt der Peptidfraktion E6F18 (Charge 040823) ist in keiner der verschiedenen Proben erkennbar. Aufgrund begrenzter Verfügbarkeit des Peptidmaterials konnte der Versuch nur einmal durchgeführt werden und sollte deshalb wiederholt werden.

## 3.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Das Peptidbankscreening der Charge 050905 mit Toxin A auf HeLa-Zellen erbrachte keine hemmenden Peptidfraktionen. Im Gegensatz dazu konnten durch Untersuchung der Peptidbankcharge 040823 mit CDT drei Peptidfraktionen (E3F10, E6F18 und E7F16) mit hemmendem Einfluss auf die Vergiftung von Vero-Zellen festgestellt werden. Alle drei Fraktionen erwiesen in vergleichenden Untersuchungen auch hemmende Wirkung auf Toxin A, während das C2-Toxin von *C. botulinum* hauptsächlich durch E6F18 und E7F16 gehemmt wurde. Die Hemmstärke von E6F18 und E7F16 war auf alle drei untersuchten Toxine deutlich potenter als von E3F10. Die stärksten Hemmeffekte wurden in Versuchen mit dem C2-Toxin gesehen. Dabei handelte es sich jedoch stets lediglich um Verzögerungen der Zellvergiftungen. 24 Stunden nach Vergiftungsbeginn waren weitestgehend alle toxininkubierten Zellen abgerundet. Am Beispiel der Peptidfraktion E6F18 wurden weitere Versuche zur Charakterisierung der Hemmwirkung durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass sich der ohnehin schwache Hemmeffekt auf Toxin A mit abnehmender Dosierung der Peptidlösung rasch verliert. Adverse Eigeneffekte im Sinne einer durch die Peptidlösung ausgelösten Zytotoxizität konnten am Beispiel von E6F18 auf Vero-Zellen ausgeschlossen werden.

Über drei rechromatographische Fraktionierungszyklen hinweg konnte der Hemmeffekt von E6F18 auf CDT reproduziert werden. Jedoch kam es mit jeder weiteren Auftrennungsstufe sukzessive zum Wirkungsverlust der Peptidfraktion. Die anschließende Isolation eines definierten Peptids war nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im Abschnitt 4.2 thematisiert.

Um den zugrundeliegenden Hemmmechanismus der Peptidfraktion E6F18 eingrenzen zu können, wurden die einzelnen Schritte der Toxinprozessierung getrennt voneinander betrachtet. Eine Hemmwirkung vermittelt durch Inhibition der enzymatischen Toxinaktivität von CDT konnte durch *in vitro ADP*-Ribosylierungsversuchen ausgeschlossen werden. Toxin-Translokationsversuche mit dem C2-Toxin deuten vielmehr auf eine Interaktion in der frühen Phase der Toxinbindung, noch vor endozytotischer Aufnahme des Toxins in die Zielzelle hin.

# 4 Diskussion

Der zunehmende Einsatz von (Breitband-)Antibiotika in Gesundheitseinrichtungen in weiten Teilen der Welt treibt nicht nur die Ausbreitung multiresistenter Keime wie dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder multiresistenter gramnegativer Erreger (MRGN) voran. Die damit verbundene Verdrängung der physiologischen Darmflora ermöglicht dem Bakterium *Clostridium difficile,* aufgrund von Resistenzen gegenüber einer Vielzahl moderner Antibiotika, die ungehinderte Ausbreitung im menschlichen Darm, wodurch *C. difficile* als Hauptverursacher nosokomialer Durchfallerkrankungen Bekanntheit erlangte (Bartlett et al. 1978). Zunächst leichtfertig als lästigen Nebeneffekt der Antibiotikatherapien abgetan, ließen die schlagartigen epidemiologischen Veränderungen im Laufe der vergangenen Dekade die *C. difficile* assoziierten Erkrankungen (CDAD) zu einem enormen Problem der Gesundheitssysteme weltweit werden (Ghose 2013; Lessa et al. 2012; McDonald et al. 2005; Seedat u. Marcus 2013; Warny et al. 2005). Der bisherige therapeutische Goldstandard beschränkt sich auf Antibiotika wie Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomicin. Unter primär erfolgreicher Therapie wurden in den letzten Jahren jedoch immer häufiger rekurrente Krankheitsverläufe beschrieben (Pepin et al. 2007). Die zunehmende Resistenzlage bei gleichzeitig stagnierendem Angebot neuartiger antimikrobieller Substanzen erklärt die energischen Bestrebungen nach neuartigen Therapiemethoden (Clatworthy et al. 2007). Zudem richteten sich die bisherigen Therapieansätze lediglich gegen die Bakterien, nicht aber gegen die Toxine, welche als Hauptvirulenzfaktoren für die Pathogenese der CDAD zum Zeitpunkt der Erkrankung bereits in großen Mengen im Darm vorliegen. Aktuelle alternative Ansätze zur konventionellen antibiotischen Therapie umfassen unter anderem fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT), Probiotika, Toxinbindner auf Polymerbasis, Immunotherapie sowie auch peptiderge Toxininhibitoren (Austin et al. 2014; Evans u. Johnson 2015; Peppe et al. 2008; Abdeen et al. 2010).

Auf der Suche nach spezifischen pharmakologischen Toxininhibitoren stellt die Identifizierung von Peptiden aus humanem Hämofiltrat eine ausgezeichnete

Möglichkeit dar. Gegenüber anderer kleiner Moleküle oder größerer Proteine kann hinsichtlich eines klinischen Einsatzes von einer vergleichsweise guten Verträglichkeit und einer geringen Gefahr unerwünschter Immunreaktionen ausgegangen werden. Dies prädestiniert körpereigene Peptide für pharmakologische Zwecke (Guani-Guerra et al. 2010; Munch et al. 2007). Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit nahtlos an weitere Peptidprojekte innerhalb der AG Barth mit dem Diphtherie-Toxin (DT) von *Corynebacterium diphtheriae* (Fischer 2014) und dem C2-Toxin von *C. botulinum* (Hegenauer 2014) angeknüpft werden.

## 4.1 Drei Peptidfraktionen hemmen die Zellvergiftung durch Toxin A und CDT

Die vom Ulmer Zentrum für Peptidpharmazeutika (U-PEP) durch Herrn Dr. Ständker bereitgestellte Peptidbank umfasst acht Eluate zu je 48 Peptidfraktionen, die durch einen standardisierten, zweischritten Trennungsprozess aus bis zu 10 000 L humanem Hämofiltrat hergestellt wurden. Es wird von einer Gesamtzahl von über einer Million unterschiedlicher Peptide und kleinster Proteine mit einer Gesamtmolekülmasse < 30 kDa ausgegangen, die auf diese Weise unterschiedlichen Screeningverfahren zugänglich gemacht werden (Schulz-Knappe et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Chargen der Peptidbank zum Screening verwendet, die sich hinsichtlich ihres Peptidgehaltes unterschieden. Die Charge 050905 lag im 2 L HF-Äquivalent vor, während Charge 040823 im 5 L HF-Äquivalent die 2,5-fache Peptidmenge enthielt. In einem zellbasierten Screeningverfahren wurde die Peptidbank auf inhibitorische Peptide gegen die beiden Toxine A und *Clostridium difficile* Transferase (CDT) von *C. difficile* untersucht. Toxinvermittelte, zellmorphologische Veränderungen durch Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett bildeten dabei die Grundlage für die lichtmikroskopischen Auswertungen mit anschließender quantitativer Bestimmung des Verhältnisses vergifteter, abgerundeter Zellen zu nicht-abgerundeten Zellen.

Das Peptidbankscreening der Charge 050905 mit Toxin A lieferte keine hemmenden Peptidfraktionen. Im weiteren Verlauf konnten aus der Peptidbank der Charge 040823 jedoch Fraktionen mit hemmender Wirkung gegen Toxin A

identifiziert werden. Mehrere Ursachen für das erfolglose Primärscreening mit Toxin A müssen diskutiert werden. An erster Stelle sind methodische Probleme zu nennen, aufgrund derer über einen Teil der Peptidbank keine definitive Aussage möglich war. Neben dem Fehlen einiger Peptidfraktionen in der Peptidbankcharge 050905, traten überwiegend während der ersten Vergiftungsversuche große Schwankungen der Vergiftungskinetik auf, was sich durch mitunter drastische Standardabweichungen innerhalb der Positiv-Kontrollen äußerte und folglich die Aussagekraft des jeweiligen Versuchs einschränkte. Desweiteren erfolgte das Primärscreening mit einer Peptidbank im vergleichsweise niedrigen Hämofiltrat-Maßstab (2 L HF-Äquivalent). Im Verlauf konnte demonstriert werden, dass Hemmeffekte auf Toxin A im Vergleich zu anderen Toxinen ohnehin nur sehr schwach ausgeprägt waren. Am Beispiel der Peptidfraktion E6F18 (Charge 040823) verlor sich der Hemmeffekt auf Toxin A nach Anpassung der Peptidkonzentration auf den zum Primärscreening verwendeten 2 L HF-Maßstab der Charge 050905 weitestgehend.

Das Peptidbankscreening mit Toxin A sollte wiederholt werden. Dabei ist vor allem auf einen adäquaten Maßstab der Peptidbank zu achten, da bisher festgestellte Hemmeffekte auf dieses Toxin vergleichsweise schwer erkennbar waren und bei niedriger Peptiddosierung leicht übersehen werden können. Bei vorliegender Fragestellung empfiehlt sich zukünftig der Einsatz einer Peptidbank im 5 L HF-Äquivalent oder höher.

Im Peptidbankscreening der Charge 040823 (5 L HF-Äquivalent) mit CDT konnten die hemmenden Peptidfraktionen E3F10, E6F18 und E7F16 bestätigt werden. Keine der drei Peptidfraktionen konnte die Vergiftung gänzlich verhindern. Es zeigte sich lediglich eine Verzögerung der Vergiftungskinetik. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren in An- und Abwesenheit von Peptidmaterial stets alle Zellen unter Toxininkubation abgerundet. Worin der zeitabhängige Verlust der Hemmwirkung begründet liegt, lässt sich bis zur Identifizierung des Zielpeptids und der abschließenden Aufklärung des Hemmmechanismus nicht sicher sagen. Dessen ungeachtet wäre ein zellvermittelter Abbau der hemmenden Peptidsubstanzen eine denkbare Erklärung. Dies kann prinzipiell ihm Rahmen einer endozytotischen Aufnahme mit anschließendem lysosomalem Abbau oder durch

die direkte Sekretion von Proteasen durch die epithelialen Zellen selbst geschehen. Wirkungsverluste durch die zeitabhängige Auflösung nicht-kovalenter Bindungen könnten im Falle einer direkten Interaktion des Peptids mit dem Toxin oder dem Rezeptor ebenfalls ursächlich sein.

E6F18 und E7F16 stellten sich als Peptidfraktionen mit starkem, unspezifischem Hemmeffekt auf verschiedene Toxine heraus. Der Hemmeffekt konnte in abnehmender Potenz für die Toxine C2, CDT und Toxin A nachgewiesen werden. E7F16 zeigte auf alle untersuchten Toxine einen stärkeren Hemmeffekt als E6F18. Der Hemmeffekt von E3F10 konnte ebenfalls wiederholt bestätigt werden und erwies sich deutlich schwächer als jener von E7F16 und E6F18. Interessanterweise scheint E3F10 als einzige der drei Peptidfraktionen eine gewisse Toxinspezifität für CDT und Toxin A gegenüber C2 zu besitzen.

Die Verteilung der Hemmstärke mit potenteren Hemmeffekten von E6F18 und E7F18 auf die binären Toxine C2 und CDT und der schwächeren Wirkung auf das einkettige Toxin A erscheint unter Berücksichtigung der jeweiligen Toxinstruktur und der zellulären Wirkmechanismen plausibel. Eine hinreichende Erklärung für die scheinbare Spezifität von E3F10 für die Toxine von *C. difficile* im Vergleich zur schwachen Wirkung auf das C2-Toxin ist dagegen noch ausstehend.

V. Hegenauer konnte im Peptidbankscreening der Charge 040823 mit dem C2-Toxin ebenfalls die Peptidfraktion E6F18 identifizieren und zusätzlich Hemmeffekte gegenüber dem CDT-verwandten Iota-Toxin (I), sowie dem Diphtherie-Toxin (DT) nachweisen. E5F25, eine zweite von V. Hegenauer identifizierte Peptidfraktion, erwies sich in seinen Versuchsreihen deutlich spezifischer für das C2-Toxin und zeigte scheinbar weder Wirkung auf Vergiftungen mit I- noch dem DT (Hegenauer 2014). Aus dem Peptidbankscreening einer weiteren Charge mit dem DT berichtete S. Fischer von sechs hemmenden Peptidfraktionen, welche allesamt negativ auf das C2-Toxin getestet wurden. Lediglich eine Fraktion zeigte einen Hemmeffekt gegen das Fusionstoxin PA63/His6-C2I (Fischer 2014).

In diesem Kontext erscheinen die Toxin-unspezifischen Effekte von E6F18 und E7F16 besonders bemerkenswert und lassen viele Fragen hinsichtlich eines möglichen Hemmmechanismus offen. Allen voran, ob im Falle von E6F18

tatsächlich ein einzelnes definiertes Peptid einen Hemmeffekt gegenüber den fünf untersuchten Toxinen vermittelt. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen die Fraktion E6F18 ausgewählt.

## 4.2 Weiterverfolgung der Trefferfraktion E6F18

Über insgesamt drei rechromatographische Auftrennungszyklen konnte der Hemmeffekt von E6F18 auf CDT weiterverfolgt werden. Insbesondere im Zuge der ersten rechromatographischen Fraktionierung schien sich der Hemmeffekt der Ausgangsfraktion jedoch über mehrere Subfraktionen zu verteilen und einen Teil seiner vorherigen Hemmstärke einzubüßen.

Eine vergleichende Untersuchung mit dem C2-Toxin unter Inkubation einiger Subfraktionen der ersten Auftrennungsstufe, welche im CDT-Screening für relevant befunden wurden, lieferte ein entsprechendes Hemmprofil, welches sich über mehrere Nachbarfraktionen erstreckte. Die inhibitorische Wirkung der Subfraktionen imponierte auf C2 jedoch wiederholt wesentlich potenter als auf CDT und ließ ein durchaus äquipotentes Hemmbild zur Ausgangsfraktion erkennen. Refraktionierungen zur Verfolgung eines Zielpeptids scheinen unter dem C2-Toxin also weitestgehend ohne Verluste der Hemmwirkung möglich zu sein. Dies konnte auch von V. Hegenauer demonstriert werden (Hegenauer 2014). Interessanterweise wurde der jeweils stärkste Hemmeffekt auf die beiden Toxine durch verschiedene Subfraktionen herbeigeführt. Dies könnte ein Indiz für unterschiedliche, wenn auch strukturell höchstwahrscheinlich sehr ähnliche Zielpeptide innerhalb der Peptidfraktion E6F18 sein.

Trotz wiederholter Anpassung der Peptidkonzentration verlor sich die Hemmwirkung von E6F18 auf CDT mit jeder Refraktionierung zunehmend. In der dritten Auftrennungsstufe konnte schließlich ein schwacher Hemmeffekt in der Peptidfraktion E6F18.SF19.SSF14+15.SSSF18 bestätigt werden. Nach Angaben von Herrn Dr. Ständker (U-PEP) könne nun eine massenspektrometrische Isolation des Zielpeptids erfolgen.

Tatsächlich gelang es der AG Barth in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ständker und der *pharis biotec GmbH* (Hannover) nach Beendigung der Versuchsreihen für diese

Arbeit einzelne definierte Peptide mit Hemmwirkung unter anderem gegen CDT aus der oben genannten Fraktion zu isolieren. Aus patentrechtlichen Gründen konnten mir nähere Informationen, wie die Aminosäuresequenz dieser Peptide nicht mitgeteilt werden. Umfangreiche Versuche zur Analyse der gefundenen Peptide sind ausstehend (AG Barth, unveröffentlichte Ergebnisse).

Einige weiter fortgeschrittene Peptidprojekte veranlassen zur Hoffnung auf eine mögliche Wiederherstellung der Hemmstärke oder sogar deren Erhöhung nach Isolation und Identifikation des Zielpeptids. So konnte am Beispiel von VIRIP, einem aus einer gleichartigen Peptidbank stammenden, peptidergen Inhibitor des HI-Virus, die antiretrovirale Potenz durch Austausch nur weniger Aminosäuren drastisch erhöht werden (Munch et al. 2007). Nach einem ähnlichen Prinzip gelang es E.M. Borst et al. die antivirale Aktivität von CYVIP gegenüber dem Zytomegalievirus zu verstärken. Zudem stellten sie fest, dass die nötige Mindestdosis des Peptids abhängig von der jeweilig verwendeten Zelllinie war (Borst et al. 2013). Eine derartige Zelltypabhängigkeit der Hemmeffekte konnte in meinen durchgeführten Versuchen bislang nicht bestätigt werden. Da es sich bei CYVIP um ein antivirales Peptid und demnach um einen gänzlich anderen Wirkmechanismus handelt, ist eine vergleichbare Abhängigkeit ohnehin fraglich.

Dass peptiderge Hemmeffekte im Verlauf potenziert werden können, lässt sich auch am Beispiel inhibitorischer Peptide gegen bakterielle Toxine belegen. Insbesondere das Anthrax-Toxin von *Bacillus anthracis* war in den vergangenen Jahren, mitunter aufgrund seiner Relevanz als Biowaffe, Gegenstand aktiver Bestrebungen bei der Suche nach neuartigen Toxininhibitoren. Obwohl das Toxin aus drei Komponenten besteht, wird es aufgrund der großen Gemeinsamkeiten der einzelnen Komponenten häufig zu den binären Toxinen gezählt. PA vermittelt die Rezeptorbindung und entspricht der B-Komponente binärer Toxine, welche mit den beiden unterschiedlichen A-Komponenten *Lethal factor* (LF) und *Edema factor* (EF) interagieren kann. Zur Ausübung seiner Zytotoxizität ist das gemeinsame Vorhandensein von PA mit LF oder EF notwendig (Barth et al. 2004).

Im Rahmen eines Peptidbankscreenings durch die Phagen-Display-Methode konnten M. Mourez et al. hemmende Peptide gegen das Anthrax-Toxin identifizieren, die durch Bindung an die oligomerisierte PA-Komponente die

Interaktion mit LF und EF verhindern. Anschließend gelang ihnen die Synthese eines polyvalenten Inhibitors durch kovalentes Zusammenfügen mehrerer Kopien desselben Peptides an ein Bindeglied auf Polyacrylamidbasis. Das monomere Peptid ließ *in vitro* eine Bindung an PA erkennen, konnte auf die Toxizität jedoch keine Effekte darstellen. Im Gegensatz dazu konnte durch den polyvalenten Inhibitor sowohl in zellbasierten Versuchen, als auch am Tiermodell eine Intoxikation gänzlich verhindert werden (Mourez et al. 2001). Pini et al. isolierten mit Hilfe der Phagen-Display-Methode einen ähnlichen Inhibitor. Zur Augmentation des Hemmeffektes wurde das Peptid mehrfach verzweigt an einen Lysin-Kern gekoppelt und ein sogenanntes *Multiple Antigen Peptide* (MAP) synthetisiert. Während das monomere Peptid selbst im 200-fachen Überschuss keine signifikante Hemmung erkennen ließ, konnte das Peptid in MAP-Struktur in deutlich geringerer Konzentration eine signifikante Hemmung der Vergiftung erzielen (Pini et al. 2006). Die Zunahme der Hemmpotenz ist nicht der einzige Vorteil, den man sich vom Einsatz derartiger MAPs im Vergleich zum einzelnen Peptid erhoffen kann. MAPs weisen eine gewisse Stabilität gegenüber im Serum vorkommender Peptidasen und Proteasen auf und könnten für die in Abschnitt 4.1 beschriebene Problematik des raschen zeitlichen Wirkungsverlustes eine potentielle Optimierungsstrategie darstellen (Bracci et al. 2003).

In Analogie hierzu erfolgte durch S. Basha et al., ebenfalls im Phagen-Display-Screening, die Identifikation von Peptidinhibitoren gegen die beiden Rezeptoren des Anthrax-Toxins mit anschließender Synthese eines polyvalenten Inhibitors durch Kopplung der Peptide an Liposomen. So gelang eine 50.000-fache Aktivitätssteigerung des polyvalenten Inhibitors im Vergleich zum monovalenten Peptid (Basha et al. 2006).

Diese Beispiele demonstrieren nicht nur die Möglichkeit der Optimierung pharmakokinetischer und -dynamischer Eigenschaften eines identifizierten Peptids (i) durch nachträgliche Modifikation des Peptids selbst oder (ii) durch Synthese eines polyvalenten Inhibitors, sondern auch den alternativen Weg eines Peptidbankscreenings mit Hilfe der Phagen-Display-Methode (Zwick et al. 1998). Auf Vor- und Nachteile dieser Methode im Vergleich zum in dieser Arbeit durchgeführten Peptidbankscreening wird an dieser Stelle nicht vertiefend

eingegangen. Dass die Methode aber auch zum Screening für die Toxine von *C. difficile* zielführend sein kann, wurde von S.J. Abdeen et al. demonstriert. Mit der enzymatisch aktiven Domäne von Toxin A als Zielstruktur konnten gleich zwei Peptide isoliert werden, die sich als Hemmstoffe beider Hauptvirulenzfaktoren herausstellten und signifikant die Glykosylierung von Rho-Proteinen durch Toxin A und B hemmen (Abdeen et al. 2010).

## 4.3 Analyse des Hemmmechanismus von E6F18

Noch bevor ein definiertes Peptid isoliert werden konnte, wurden anhand der Peptidfraktion E6F18 Untersuchungen zur Eingrenzung des zugrundeliegenden Hemmmechanismus durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Schritte der Toxinprozessierung mit Hilfe von *in vitro* ADP-Ribosylierungsversuchen und Toxin-Translokationsversuchen getrennt voneinander betrachtet. Nach kurzer Schilderung der aus diesen Versuchen entstandenen Beobachtungen folgt eine ausführliche Auseinandersetzung zur Einschätzung der Ergebnisse.

Im *in vitro* Vergiftungsversuch wurde in An- und Abwesenheit von E6F18 die enzymatische Aktivität von CDTa isoliert untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die inhibitorische Wirkung der Peptidfraktion nicht auf einer Hemmung der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität von CDT beruht.

Zum gleichen Schluss kommt V. Hegenauer, der in analoger Versuchsdurchführung die Wirkung von E6F18 auf das C2-Toxin überprüfte (Hegenauer 2014).

Durch Hemmung der endosomalen Toxinprozessierung mittels Bafilomycin A1, einem Hemmstoff der v-ATPase in den Endosomen der Zielzellen, und Ansäuern des extrazellulären Mediums, konnte im Toxin-Translokationsversuch eine artifizielle Zellvergiftung mit direkter Toxin-Translokation über die Zellmembran mit dem C2-Toxin erzeugt werden. Die aus diesem Versuch hervorgegangenen Beobachtungen liefern starke Hinweise dafür, dass die Hemmung von E6F18 auf das C2-Toxin zeitlich vor der endozytotischen Toxinaufnahme und der anschließenden Translokation ins Zytosol stattfindet. Eine direkte Interaktion mit einer der beiden Toxinkomponenten oder dem Toxinrezeptor wären denkbare Angriffspunkte. Von einer Hemmung der notwendigen Aktivierung der

Bindekomponente C2II ist dagegen nicht auszugehen, da C2II für die Versuche bereits im Vorfeld aktiviert wurde. Diese Hypothese ließe sich mit den Beobachtungen aus den *in vitro* Versuchen vereinbaren. Obwohl beiden binären Toxinen CDT und C2 eine gewisse strukturelle Verwandtschaft gemein ist, können die Erkenntnisse selbstverständlich nicht gegenseitig übertragen werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Hemmwirkung von E6F18 sind ebenso umfangreich wie die Möglichkeiten ihrer Interpretation. Der Hemmeffekt von E6F18 konnte, V. Hegenauers Ergebnisse eingeschlossen, gegenüber der fünf AB-Toxine CDT und Toxin A von *C. difficile*, C2 von *C. botulinum*, Iota von *C. perfringens* und DT von *Corynnebacterium diphtheriae* gezeigt werden. Die Toxine unterscheiden sich zum Teil drastisch in Bezug auf Struktur und Funktionsweise, teilen aber auch einige Gemeinsamkeiten. Angesichts dieser Tatsache müssen grundsätzlich zwei konträre Szenarien berücksichtigt werden. Entweder (i) ein einzelnes Peptid innerhalb der Peptidfraktion E6F18 ist imstande alle bislang überprüften bakteriellen Toxine zu hemmen oder (ii) es liegen mehrere verschiedene Peptide vor, die die jeweiligen Toxine auf jeweils unterschiedliche Weise inhibieren.

Geht man vom naheliegenden Fall (i) aus, dass alle beschriebenen Hemmeffekte durch ein definiertes Peptid ausgelöst werden, so wäre das Vorhandensein einer gemeinen Zielstruktur plausibel, die für alle fünf Toxine relevant ist. Unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Ergebnisse der analytischen Versuche zum Hemmmechanismus dezimieren sich die möglichen Ansatzpunkte auf eine Interaktion des Peptids mit dem Toxin, dem Toxinrezeptor oder einer Beeinflussung der Porenbildung.

Am unwahrscheinlichsten ist wohl eine Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor. Am Beispiel des Anthrax-Toxins konnten zwar bereits Peptide isoliert werden, die möglicherweise beide Anthrax-Toxinrezeptoren (ANTXR 1 & 2) binden, jedoch scheint der vorliegende Sachverhalt komplexer (Basha et al. 2006). Lediglich CDT und Iota agieren über einen gemeinsamen Rezeptor, während C2 und DT über jeweils eigene Rezeptoren verfügen oder im Fall von Toxin A dieser noch gar nicht bekannt ist (Papatheodorou et al. 2011; Eckhardt et al. 2000; Naglich et al. 1992; Jank u. Aktories 2008).

Eine Hemmung der Toxine selbst wäre prinzipiell denkbar. Dagegen spricht, dass es sich bei CDT, C2 und Iota um binäre Toxine handelt, während Toxin A und DT eine einkettige Toxinstruktur aufweisen (Barth et al. 2004; Jank u. Aktories 2008; Collier 1975). Mourez et al. und Pini et al. identifizierten unabhängig voneinander Peptide, welche die Bindung der A-Komponente an die B-Komponente des Anthrax-Toxins verhindern (Mourez et al. 2001; Pini et al. 2006). Ein derartiger Mechanismus scheint für die beiden einkettigen Toxine nicht plausibel. Tolevamer hingegen ist ein bereits in Studien der Phase I-III erprobter Inhibitor der einkettigen Toxine A und B von *C. difficile*. Durch großflächige Interaktion ist er in der Lage sowohl Toxin A als auch Toxin B von *C. difficile* zu binden und Zellen auf diese Weise vor der Intoxikation zu schützen (Louie et al. 2006; Peppe et al. 2008; Johnson et al. 2014). Ob sich dieser Wirkmechanismus auch auf binäre Toxine anwenden ließe bleibt dahingestellt. Bei Tolevamer handelt es sich jedoch um ein großes Polymer mit einer Molekülmasse von etwa 600 kDa und liegt somit weit über dem *Cut-off* der in dieser Arbeit verwendeten Peptidbank von etwa 30 kDa (Braunlin et al. 2004). Höchst interessant sind in diesem Kontext die Erkenntnisse von Aktories et al. über die Wirkung von humanen α-Defensinen auf die Pathogenität von *C. difficile*. Neben diversen antimikrobiellen Effekten gegen das Bakterium selbst, wurden zwei verschiedenartige toxininhibitorische Mechanismen festgestellt. Am Beispiel von Toxin B wurde für die drei α-Defensine HNP-1, HNP-3 und HD-5 in niedriger Konzentration eine Hemmung der Glykosyltransferaseaktivität nachgewiesen, während beim Einsatz in höheren Konzentrationen eine Inaktivierung durch Bildung von Toxinaggregaten beschrieben wurde. Dabei zeigen HNP-1 und -3 eine bevorzugte Wirkung auf die Enzymaktivität, während HD-5 eine potentere Toxinaggregation auslöst. Beide Effekte scheinen unabhängig voneinander zu existieren und äußern sich unspezifisch auf verschiedene einkettige, sowie binäre Toxine, nicht jedoch auf Toxin A (Giesemann et al. 2008). Diese Beobachtungen lassen interessante Rückschlüsse zu und bestärken die formulierte Hypothese (i), dass ein einzelnes Peptid (mittels unterschiedlicher Mechanismen) verschiedene Toxine hemmen kann. Insbesondere die beschriebene Fähigkeit zur Auslösung von Toxinaggregaten ließe sich mit den Versuchen zum Hemmmechanismus von E6F18 vereinbaren, zumal α-Defensine als Peptide mit einer Molekülmasse von ca. 3,5-6 kDa Bestandteil der zum Screening verwendeten Peptidbank sind. In diesem

Zusammenhang sollte jedoch die Herkunft der einzelnen α-Defensine berücksichtigt werden. Während HNP-1 und HNP-3 von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden, stammt HD-5 aus den Paneth-Zellen des Dünndarms (Furci L et al. 2015). Diese Kenntnis ist von Relevanz, wenn man sich die Herstellung der Peptidbank vor Augen hält. Endokrin sezernierte Peptide befinden sich in hohen Konzentrationen im Blut und lassen sich durch Hämofiltration einfach isolieren, während sich exokrin sezernierte Peptide primär im jeweiligen Sekret nachweisen lassen und lediglich durch Diffusion in geringen Mengen in das Blut übertreten (Schulz-Knappe et al. 1997). Es ist also fraglich, in welchem Maße das α-Defensin HD-5, welches die deutlichste Fähigkeit zur Bildung von Toxinaggregaten aufweist, überhaupt in der verwendeten Peptidbank vertreten ist. Der fehlende Hemmeffekt auf Toxin A macht die drei erwähnten α-Defensine ohnehin zu unwahrscheinlichen Kandidaten auf der Suche nach dem Zielpeptid der Fraktion E6F18. Sie sind jedoch ein eindrückliches Beispiel für das mannigfaltige Wirkungsspektrum, welches von einem einzelnen Peptid ausgehen kann und widerlegen die Annahme, dass ein Peptid nur einen Wirkmechanismus haben kann.

Als dritte mögliche Option steht die Hemmung der Porenbildung, denn sie ist ein essentieller Schritt in der zellulären Aufnahme aller untersuchter Toxine (Barth et al. 2000; Blocker et al. 2001; Kaiser et al. 2011; Giesemann et al. 2006; Kagan et al. 1981). AMBnTßCD ist ein Vertreter der Familie der ß-Cyclodextrine und ein spannendes Beispiel für einen Inhibitor der binären Toxine CDT, C2, Iota und LF des Anthrax-Toxins, der seine Hemmwirkung durch Interaktion mit der Toxinpore erzielt. Zur Determinierung des genauen Wirkmechanismus führten Nestorovich et al. unter anderem einen Toxin-Translokationsversuch nach analogem Vorgehen wie in dieser Arbeit durch. Gegensätzlich zu den Beobachtungen mit der Peptidfraktion E6F18 äußerte sich der Hemmeffekt von AMBnTßCD auf die Vergiftung mit dem C2-Toxin jedoch lediglich bei simultaner Applikation mit dem sauren Medium (Nestorovich et al. 2011; Roeder et al. 2014). Im Falle von AMBnTßCD spricht dies für eine Blockade der bereits existierenden Toxinpore, was für den Hemmeffekt von E6F18 bereits ausgeschlossen werden konnte. Zahlreiche weitere Beispiele für Hemmstoffe der bakteriellen Toxinporen können genannt werden. All diese agieren jedoch durch einen direkten Block der bereits gebildeten Pore und zählen zudem

wie AMBnTßCD nicht zu den niedermolekularen, körpereigenen Peptiden (Hovey et al. 1999; Forstner et al. 2014; Bronnhuber et al. 2014). Dass dem Hemmeffekt von E6F18 ein Peptid zugrunde liegt, welches zur Hemmung der Porenbildung von einkettigen und binären Toxinen befähigt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, scheint bei aktuellem Kenntnisstand aber eher unwahrscheinlich.

Die zweite Hypothese (ii), dass die Peptidfraktion E6F18 mehrere toxininhibitorische Peptide beherbergt, deren Zusammenspiel den beschriebenen Hemmeffekt auf verschiedenartige Toxine erklärt, ist ein weiteres denkbares Szenario. Einige Beobachtungen aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen stützen diese Vermutung. So könnte ein Verlust synergistisch wirkender Peptide durch wiederholte rechromatographische Fraktionierungen den sukzessiven Verlust der Hemmstärke von E6F18 auf CDT erklären. Dies wirft zeitgleich die Frage auf, weshalb in vergleichenden Untersuchungen der ersten Auftrennungsstufe von E6F18 mit dem C2-Toxin kein Hemmverlust verzeichnet wurde. Die Tatsache, dass sich der Hemmeffekt von E6F18 auf die beiden Toxine zwar über dieselben Nachbarfraktionen, jedoch mit unterschiedlicher Präferenz auf einzelne Subfraktionen verteilte, könnte ein Indiz dafür sein, dass mehrere Peptide involviert sind. Es erscheint zudem plausibel, dass eine aus zwei chromatographischen Auftrennungsprozessen hervorgegangene Peptidfraktion einige strukturell ähnliche Peptide beherbergt, die sich auch in ihrer bioaktiven Wirkung entweder ähneln oder möglicherweise synergistisch verhalten.

Nach Identifizierung eines definierten, inhibitorischen Peptids gegen die Vergiftung von CDT wäre neben obengenannten Möglichkeiten zur Augmentation der Hemmstärke eine erneute Suche nach synergistisch wirkenden Peptiden innerhalb der Peptidfraktion E6F18 sinnvoll. Dies könnte beispielsweise primär durch gleichzeitige Inkubation des Peptids mit der Ausgangsfraktion E6F18 und im Nachfolgenden durch Weiterverfolgung anderer, benachbarter Subfraktionen in neuen Auftrennungszyklen erfolgen. Neben der Hoffnung auf eine Steigerung der Hemmstärke wären zudem vergleichende Untersuchungen mit anderen Toxinen und weiterführende Analyse des zugrundeliegenden Hemmmechanismus der einzelnen Peptide vielversprechend.

## 4.4 Untersuchung von E6F18 auf adverse Eigeneffekte

Am Beispiel der Inkubation von Vero-Zellen in An- und Abwesenheit von Peptidmaterial der Fraktion E6F18 konnten keine adversen Eigeneffekte im Sinne einer durch die Peptidlösung ausgelösten Zytotoxizität festgestellt werden. Vielmehr äußerten sich die peptidbehandelten Zellen nach 24 h durch eine etwas geringere Zellabrundung als die unbehandelten Zellen der Negativ-Kontrollgruppe. Diese Beobachtung wirft die Frage nach einem allgemeinen, zytoprotektiven Effekt, ausgehend von E6F18 auf. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Verhinderung der Ablösung der Zellen vom Boden der Zellschale durch Stabilisierung der Zellkontakte. In Abwesenheit von Toxinen kommen runde Zellen auch häufig im Rahmen der mitotischen Zellteilung vor. Endogene Peptide mit hemmendem Einfluss auf die Mitose wären von großem wissenschaftlichen Interesse. Unabhängig der zugrundeliegenden Erklärung dieser Beobachtung ist es jedoch äußerst fraglich, ob dieser Peptideffekt eine ausreichende Erklärung für eine derartig potente Hemmwirkung gegenüber den unterschiedlichen Toxinen bietet.

Untersuchungen von S. Fischer zur Überprüfung der Zytotoxizität von Peptidfraktionen deren Hemmwirkung DT, nicht jedoch dem C2-Toxin gelten, zeigten für alle sechs von ihm untersuchten Fraktionen die identische Beobachtung (Fischer 2014). Der beschriebene Peptideffekt ist also neben E6F18 auch für Peptidfraktionen nachweisbar, deren Hemmwirkung nur spezifischen Toxinen gilt. Als kausale Erklärung für die toxininhibitorischen Wirkungen der Peptidfraktionen kann dieser Effekt also ausgeschlossen werden. Dass beide Effekte parallel existieren ist aber durchaus möglich und sollte hinsichtlich der mitunter sehr interessanten Erklärungshypothesen unbedingt näher untersucht werden. Zunächst empfiehlt es sich weitere „Kontrollpeptidfraktionen“ zu testen, die im Screening auf die bakteriellen Toxine unauffällig imponierten. Darüber hinaus könnten spezifische Assays mit Mitosemarkern, wie beispielsweise der in der Pathologie gebräuchlichen immunhistochemischen Darstellung von Ki-67, oder der zellulären Adhäsionskontakte, beispielsweise durch Darstellung von Proteinen der Cadherin- oder Integrin-Familie, weitere Erkenntnisse liefern.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Peptidmaterials war eine Überprüfung der Zytotoxizität mit den hemmenden Peptidfraktionen E3F10 und E7F16 leider

nicht mehr möglich. Im Zuge der Weiterverfolgung der beiden Fraktionen in neuen Peptidprojekten, sollten vergleichende Versuche zum Eigeneffekt mit den bereitgestellten Aufreinigungen erfolgen.

## 4.5 Ausblick

Mit der Identifizierung mehrerer inhibitorischer Peptidfraktionen gegen CDT und Toxin A von *C difficile* liefert die vorliegende Arbeit einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung neuartiger Hemmstoffe bakterieller Virulenzfaktoren. Am Beispiel der Peptidfraktion E6F18 konnten weitreichende Erkenntnisse zur Charakterisierung des Hemmeffekts und zur Analyse des zugrundeliegenden Hemmmechanismus gewonnen, sowie anhand vergleichender Untersuchungen mit dem C2-Toxin von *C. botulinum* eine Verknüpfung zum umfangreichen Peptidprojekt der AG Barth geschlossen werden. Neben den neuen Erkenntnissen wirft die vorliegende Arbeit, wie bereits an den jeweiligen Stellen angesprochen, interessante Fragen auf und eröffnet Möglichkeiten für weiterführende Projekte. Insbesondere die Weiterverfolgung des Hemmeffekts von E6F18 über mehrere Auftrennungszyklen stellt die Basis für die inzwischen erfolgte Isolation einzelner definierter Peptide dar. Im weiteren Verlauf sollten diese synthetisch hergestellt und hinsichtlich ihrer Hemmwirkung überprüft werden. Anschließend sollten Versuche zur Aufklärung des Hemmmechanismus, beispielsweise durch Rezeptorbindungs-Assays mit anschließender *in vitro* Detektion des fluoreszenzmarkierten Peptids, durchgeführt werden.

Neben der weiteren Abklärung etwaiger zytoprotektiver Eigeneffekte von E6F18, sollten auch die beiden Peptidfraktionen E3F10 und E7F16 dahingehend untersucht werden. Darüber hinaus scheint eine Weiterverfolgung der Hemmeffekte dieser beiden Peptidfraktionen durch rechromatographische Auftrennungen ebenfalls sinnvoll. E3F10 könnte auf der Suche nach toxinspezifischen Inhibitoren von Interesse sein, während E7F16 allein durch die enorme Hemmstärke von Relevanz ist.

Toxin B ist der zweite Hauptvirulenzfaktor von C. difficile und zeigt bezüglich seiner Struktur und Funktionsweise hohe Ähnlichkeit zu Toxin A, obgleich zum

vollständigen Verständnis der beiden Toxine bis heute viele Fragen offen bleiben und jüngere Studien vermehrt Unterschiede zwischen den beiden Toxinen aufdecken (Chaves-Olarte et al. 1997; Jank u. Aktories 2008; LaFrance et al. 2015). Eine Überprüfung der bisher bestätigten Peptidfraktionen mit Toxin B wäre also nicht nur hinsichtlich des therapeutischen Stellenwerts von großem Interesse. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Inhibitor von Toxin A ebenfalls gegen Toxin B wirkt ist zwar hoch, wurde jedoch bereits beispielhaft widerlegt (Giesemann et al. 2008; Abdeen et al. 2010). Gegensätzliche Ergebnisse wären aus toxikologischer Sicht interessant und könnten weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der beiden AB-Toxine liefern.

# 5 Zusammenfassung

*Clostridium (C.) difficile* ist der wichtigste Auslöser nosokomialer Durchfallerkrankungen, welche in der vergangenen Dekade einen besorgniserregenden epidemiologischen Wandel durchlaufen haben. Die zunehmende Inzidenz von Krankheitsausbrüchen, sowie die erhöhte Mortalität, sind assoziiert mit dem Auftreten neuer hypervirulenter Stämme. Diese Stämme sind unter anderem durch die Produktion großer Mengen der beiden Hauptvirulenzfaktoren Toxin A und Toxin B, sowie der zusätzlichen Bildung eines dritten Toxins, der *Clostridium difficile* Transferase (CDT) gekennzeichnet, welches als additiver Virulenzfaktor diskutiert wird. Antibiotikatherapien gelten als Hauptauslöser der Erkrankung, sind zugleich aber auch der aktuelle therapeutische Goldstandard. Metronidazol und Vancomycin stellen zwar wirksame Mittel gegen *C. difficile* dar, beeinflussen jedoch nicht die krankheitsauslösenden Toxine, welche zum Zeitpunkt der Erkrankung bereits im Darmlumen vorliegen.

Die Identifizierung körpereigener, inhibitorischer Peptide gegen die Toxine von *C. difficile* stellte in diesem Kontext ein belangvolles Vorhaben dar. In Zusammenarbeit mit Dr. Ludger Ständker, dem Ulmer Zentrum für Peptidpharmazeutika (U-PEP) und der *pharis biotec GmbH,* wurde der AG Barth eine Peptidbank in zwei Chargen bereitgestellt. Durch einen standardisierten, zweischrittigen Prozess wurde das gesamte menschliche Peptidom, welches schätzungsweise über eine Million unterschiedliche bioaktive Peptide umfasst, auf über 350 Fraktionen verteilt und dadurch dem Screeningverfahren zugänglich gemacht.

In etablierten Vergiftungsversuchen mit epithelialen Zellreihen wurden die bereitgestellten Chargen der Peptidbank auf inhibitorische Effekte gegen die Toxine CDT und Toxin A untersucht. Toxininduzierte zellmorphologische Veränderungen waren lichtmikroskopisch einfach zu erheben und durch Bestimmung des Verhältnisses vergifteter, abgerundeter Zellen zu nicht-abgerundeten Zellen einer statistischen Auswertung leicht zugänglich.

Auf diese Weise konnten drei Peptidfraktionen mit hemmender Wirkung gegen CDT und Toxin A von *C. difficile* identifiziert werden. In vergleichenden Versuchen mit den AB-Toxinen anderer Bakterien, erwies die Peptidfraktion E3F10 eine scheinbare Präferenz für die beiden Toxine von *C. difficile* gegenüber dem C2-Toxin von *C. botulinum*, während die Hemmeffekte von E6F18 und E7F16 unspezifisch gegenüber verschiedenen Toxinen festgestellt wurden. Vergiftungen konnten unter Inkubation der hemmenden Peptidfraktionen nicht vollständig verhindert, jedoch mitunter erheblich verzögert werden.

Am Beispiel der Peptidfraktion E6F18 und dem binären Toxin CDT wurden weitere Auftrennungszyklen, sowie Versuche zur Analyse der Hemmwirkung durchgeführt. Adverse Eigeneffekte im Sinne einer durch die Peptidlösung ausgelösten Zytotoxizität konnten auf Vero-Zellen ausgeschlossen werden. Unter Einbuße der einstigen Hemmstärke, konnte der Hemmeffekt von E6F18 über drei rechromatographische Auftrennungszyklen weiterverfolgt und ausreichend eingegrenzt werden. So gelang der AG Barth in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ständker, nach Beendigung der Versuchsreihen dieser Arbeit, tatsächlich die Isolation einzelner Peptide mit Hemmwirkung unter anderem gegen CDT.

Noch vor der Identifizierung eines definierten Peptids wurden mitunter aufwändige Versuche zur Analyse des Hemmmechanismus von E6F18 durchgeführt. Die daraus hervorgegangenen Beobachtungen liefern starke Hinweise dafür, dass die von E6F18 ausgehende Hemmung zeitlich vor der endozytotischen Toxinaufnahme und der anschließenden Translokation ins Zytosol stattfindet. Eine Interaktion mit einer der beiden Toxinkomponenten, dem Toxinrezeptor oder der Porenbildung wären denkbare Angriffspunkte. Ob der unspezifische Hemmeffekt von E6F18 auf ein einzelnes Peptid zurückzuführen ist oder das komplexe Gesamtbild vielmehr durch einen Synergismus unterschiedlicher Peptide zu erklären ist, bleibt offen.

So leistet die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung neuartiger Hemmstoffe gegenüber bakterieller Virulenzfaktoren. Darüber hinaus knüpft die Arbeit direkt an andere Peptidprojekte innerhalb der AG Barth an, liefert neue Erkenntnisse die zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise bakterieller Toxine beitragen und stellt zahlreiche Fragen, die den Weg für weiterführende Projekte aufzeigen.

# 6 Literaturverzeichnis

1. Abdeen S J, Swett R J, Feig A L: Peptide inhibitors targeting Clostridium difficile toxins A and B. ACS chemical biology, 5: 1097-1103 (2010)

2. AG Barth: (unveröffentlichte Ergebnisse)

3. Aktories K, Barbieri J T: Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. Nature reviews.Microbiology, 3: 397-410 (2005)

4. Alexander, K: 3.2 Infektionen des Gastrointestinaltrakts. In: Alexander, K (Hrsg.) THIEMEs INNERE MEDIZIN TIM. Thieme, Stuttgart, S 501-502 (1999)

5. Austin M, Mellow M, Tierney W M: Fecal microbiota transplantation in the treatment of Clostridium difficile infections. The American Journal of Medicine, 127: 479-483 (2014)

6. Barth H: Bakterielle Toxine. In: Marquardt H, Schäfer S G and Barth H (Hrsg) Toxikologie, 3., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, S. 1157-1171 (2013)

7. Barth H, Aktories K, Popoff M R, Stiles B G: Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 68: 373-402, table of contents (2004)

8. 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. The Journal of biological chemistry, 275: 18704-18711 (2000)

9. 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. The Journal of biological chemistry, 276: 10670-10676 (2001)

10. Bartlett J G, Chang T W, Gurwith M, Gorbach S L, Onderdonk A B: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. The New England journal of medicine, 298: 531-534 (1978)

11. Basha S, Rai P, Poon V, Saraph A, Gujraty K, Go M Y, Sadacharan S, Frost M, Mogridge J, Kane R S: Polyvalent inhibitors of anthrax toxin that target host receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 13509-13513 (2006)

12. Blocker D, Behlke J, Aktories K, Barth H: Cellular uptake of the Clostridium perfringens binary iota-toxin. Infection and immunity, 69: 2980-2987 (2001)

13. Borst E M, Standker L, Wagner K, Schulz T F, Forssmann W G, Messerle M: A peptide inhibitor of cytomegalovirus infection from human hemofiltrate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57: 4751-4760 (2013)

14. Bracci L, Falciani C, Lelli B, Lozzi L, Runci Y, Pini A, De Montis M G, Tagliamonte A, Neri P: Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. The Journal of biological chemistry, 278: 46590-46595 (2003)

15. Braunlin W, Xu Q, Hook P, Fitzpatrick R, Klinger J D, Burrier R, Kurtz C B: Toxin binding of tolevamer, a polyanionic drug that protects against antibiotic-associated diarrhea. Biophysical journal, 87: 534-539 (2004)

16. Breton C, Snajdrova L, Jeanneau C, Koca J, Imberty A: Structures and mechanisms of glycosyltransferases. Glycobiology, 16: 29R-37R (2006)

17. Bronnhuber A, Maier E, Riedl Z, Hajos G, Benz R, Barth H: Inhibitions of the translocation pore of Clostridium botulinum C2 toxin by tailored azolopyridinium salts protects human cells from intoxication. Toxicology, 316: 25-33 (2014)

18. Carter G P, Lyras D, Allen D L, Mackin K E, Howarth P M, O'Connor J R, Rood J I: Binary toxin production in Clostridium difficile is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. Journal of Bacteriology, 189: 7290-7301 (2007)

19. 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. The Journal of clinical investigation, 100: 1734-1741 (1997)

20. Clatworthy A E, Pierson E, Hung D T: Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nature chemical biology, 3: 541-548 (2007)

21. Collier R J: Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriological Reviews, 39: 54-85 (1975)

22. Dingle T, Wee S, Mulvey G L, Greco A, Kitova E N, Sun J, Lin S, Klassen J S, Palcic M M, Ng K K, Armstrong G D: Functional properties of the carboxy-terminal host cell-binding domains of the two toxins, TcdA and TcdB, expressed by Clostridium difficile. Glycobiology, 18: 698-706 (2008)

23. Eckhardt M, Barth H, Blocker D, Aktories K: Binding of Clostridium botulinum C2 toxin to asparagine-linked complex and hybrid carbohydrates. The Journal of biological chemistry, 275: 2328-2334 (2000)

24. Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell K J, Aktories K: Auto-catalytic cleavage of Clostridium difficile toxins A and B depends on cysteine protease activity. The Journal of biological chemistry, 282: 25314-25321 (2007)

25. Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel E J, O'Keane C J, Gong D, Gao N, Xu Y L, Walker W A, LaMont J T: Diminished Clostridium difficile toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. The Journal of clinical investigation, 90: 822-829 (1992)

26. Ernst K, Liebscher M, Mathea S, Granzhan A, Schmid J, Popoff M R, Ihmels H, Barth H, Schiene-Fischer C: A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating Clostridium perfringens iota toxin. Scientific Reports, 6: 10.1038/srep20301 (2016)

27. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. Nature, 420: 629-635 (2002)

28. Evans C T, Johnson S: Prevention of Clostridium difficile Infection With Probiotics. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 60 Suppl 2: S122-8 (2015)

29. Fischer S: Inhibitorische Effekte von Peptiden aus einer humanen Hämodialysebank auf die Vergiftung von HeLa-Zellen durch das Diphtherietoxin. Masterarbeit im Studiengang Biochemie, Universität Ulm (2014)

30. Forstner P, Bayer F, Kalu N, Felsen S, Fortsch C, Aloufi A, Ng D Y, Weil T, Nestorovich E M, Barth H: Cationic PAMAM dendrimers as pore-blocking binary toxin inhibitors. Biomacromolecules, 15: 2461-2474 (2014)

31. Furci L, Baldan R, Bianchini V, Trovato A, Ossi C, Cichero P, Cirillo DM: New role for human alpha-defensin 5 in the fight against hypervirulent Clostridium difficile strains. Infection & Immunity, 83: 986-995 (2015)

32. 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)

33. Gerhard R, Tatge H, Genth H, Thum T, Borlak J, Fritz G, Just I: Clostridium difficile toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. The Journal of biological chemistry, 280: 1499-1505 (2005)

34. Geric B, Carman R J, Rupnik M, Genheimer C W, Sambol S P, Lyerly D M, Gerding D N, Johnson S: Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative Clostridium difficile strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. The Journal of infectious diseases, 193: 1143-1150 (2006)

35. Ghose,Chandrabali: Clostridium difficile infection in the twenty-first century. Emerg Microbes Infect, 2: e62 (2013)

36. Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K: Human alpha-defensins inhibit Clostridium difficile toxin B. Gastroenterology, 134: 2049-2058 (2008)

37. Giesemann T, Jank T, Gerhard R, Maier E, Just I, Benz R, Aktories K: Cholesterol-dependent pore formation of Clostridium difficile toxin A. The Journal of biological chemistry, 281: 10808-10815 (2006)

38. Goncalves S, Abade J, Teixeira A, Santos N C: Lipid composition is a determinant for human defensin HNP1 selectivity. Biopolymers, 98: 313-321 (2012)

39. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes S O, Teran L M: Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 135: 1-11 (2010)

40. Gulke 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. Infection and immunity, 69: 6004-6011 (2001)

41. Hale M L, Marvaud J C, Popoff M R, Stiles B G: Detergent-resistant membrane microdomains facilitate Ib oligomer formation and biological activity of Clostridium perfringens iota-toxin. Infection and immunity, 72: 2186-2193 (2004)

42. Hall IC O E: Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficile*. 49: 390-402 (1935)

43. Haug G, Aktories K, Barth H: The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins. Infection and immunity, 72: 3066-3068 (2004)

44. 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. The Journal of biological chemistry, 278: 32266-32274 (2003)

45. Hegenauer V: Identifizierung inhibitorischer Peptide gegen ADP-ribosylierende Bakterientoxine aus humanem Hämofiltrat, Masterarbeit im Studiengang Biochemie, Universität Ulm (2014)

46. Hilger H, Pust S, von Figura G, Kaiser E, Stiles B G, Popoff M R, Barth H: The long-lived nature of clostridium perfringens iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. Infection and immunity, 77: 5593-5601 (2009)

47. Hovey B T, Verlinde C L, Merritt E A, Hol W G: Structure-based discovery of a pore-binding ligand: towards assembly inhibitors for cholera and related AB5 toxins. Journal of Molecular Biology, 285: 1169-1178 (1999)

48. Jank T, Aktories K: Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends in microbiology, 16: 222-229 (2008)

49. Jank T, Giesemann T, Aktories K: Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function. Glycobiology, 17: 15R-22R (2007)

50. Johnson S, Louie T J, Gerding D N, Cornely O A, Chasan-Taber S, Fitts D, Gelone S P, Broom C, Davidson D M, Polymer Alternative for CDI Treatment (PACT) investigators: Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for Clostridium difficile infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 59: 345-354 (2014)

51. Just I, Gerhard R: Large clostridial cytotoxins. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, 152: 23-47 (2004)

52. 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)

53. Kagan B L, Finkelstein A, Colombini M: Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78: 4950-4954 (1981)

54. Kaiser E, Bohm 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. Cellular microbiology, 14: 1193-1205 (2012)

55. Kaiser E, Kroll C, Ernst K, Schwan C, Popoff M, Fischer G, Buchner J, Aktories K, Barth H: Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from Clostridium difficile and Clostridium perfringens is facilitated by cyclophilin A and Hsp90. Infection and immunity, 79: 3913-3921 (2011)

56. Kaiser E, Pust S, Kroll C, Barth H: Cyclophilin A facilitates translocation of the Clostridium botulinum C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. Cellular microbiology, 11: 780-795 (2009)

57. Krivan H C, Clark G F, Smith D F, Wilkins T D: Cell surface binding site for Clostridium difficile enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. Infection and immunity, 53: 573-581 (1986)

58. 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. The Journal of infectious diseases, 209: 83-86 (2014)

59. LaFrance M E, Farrow M A, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin D H, Lacy D B: Identification of an epithelial cell receptor responsible for Clostridium difficile TcdB-induced cytotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112: 7073-7078 (2015)

60. Lehrer R I, Lu W: alpha-Defensins in human innate immunity. Immunological reviews, 245: 84-112 (2012)

61. Lessa F C, Gould C V, McDonald L C: Current status of Clostridium difficile infection epidemiology. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 55 Suppl 2: S65-70 (2012)

62. Louie T J, Peppe J, Watt C K, Johnson D, Mohammed R, Dow G, Weiss K, Simon S, John J F,Jr, Garber G, Chasan-Taber S, Davidson D M, Tolevamer Study Investigator Group: Tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe Clostridium difficile-associated diarrhea. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 43: 411-420 (2006)

63. Mauss S, Chaponnier C, Just I, Aktories K, Gabbiani G: ADP-ribosylation of actin isoforms by Clostridium botulinum C2 toxin and Clostridium perfringens iota toxin. European journal of biochemistry / FEBS, 194: 237-241 (1990)

64. McDonald L C, Killgore G E, Thompson A, Owens R C,Jr, Kazakova S V, Sambol S P, Johnson S, Gerding D N: An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. The New England journal of medicine, 353: 2433-2441 (2005)

65. Menendez A, Brett Finlay B: Defensins in the immunology of bacterial infections. Current opinion in immunology, 19: 385-391 (2007)

66. Mesa J: New insulin types in type 1 diabetes mellitus. Medicina clinica, (2014)

67. Mourez M, Kane R S, Mogridge J, Metallo S, Deschatelets P, Sellman B R, Whitesides G M, Collier R J: Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. Nature biotechnology, 19: 958-961 (2001)

68. Munch J, Standker L, Adermann K, Schulz A, Schindler M, Chinnadurai R, Pohlmann S, Chaipan C, Biet T, Peters T, Meyer B, Wilhelm D, Lu H, Jing W, Jiang S, Forssmann W G, Kirchhoff F: Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. Cell, 129: 263-275 (2007)

69. Nagahama M, Hagiyama T, Kojima T, Aoyanagi K, Takahashi C, Oda M, Sakaguchi Y, Oguma K, Sakurai J: Binding and internalization of Clostridium botulinum C2 toxin. Infection and immunity, 77: 5139-5148 (2009)

70. Naglich J G, Metherall J E, Russell D W, Eidels L: Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. Cell, 69: 1051-1061 (1992)

71. Nestorovich E M, Karginov V A, Popoff M R, Bezrukov S M, Barth H: Tailored ss-cyclodextrin blocks the translocation pores of binary exotoxins from C. botulinum and C. perfringens and protects cells from intoxication. PloS one, 6: e23927 (2011)

72. 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). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 16422-16427 (2011)

73. Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerek S, Guttenberg G, Aktories K: Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. PloS one, 5: e10673 (2010)

74. Pepin J, Valiquette L, Gagnon S, Routhier S, Brazeau I: Outcomes of Clostridium difficile-associated disease treated with metronidazole or vancomycin before and after the emergence of NAP1/027. The American Journal of Gastroenterology, 102: 2781-2788 (2007)

75. Peppe J, Porzio A, Davidson D M: A new formulation of tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, is safe and well-tolerated in healthy volunteers: a randomized phase I trial. British journal of clinical pharmacology, 66: 102-109 (2008)

76. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff M R: Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by Clostridium difficile CD196. Infection and immunity, 65: 1402-1407 (1997)

77. Pfeifer G, Schirmer J, Leemhuis J, Busch C, Meyer D K, Aktories K, Barth H: Cellular uptake of Clostridium difficile toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. The Journal of biological chemistry, 278: 44535-44541 (2003)

78. Pini A, Runci Y, Falciani C, Lelli B, Brunetti J, Pileri S, Fabbrini M, Lozzi L, Ricci C, Bernini A, Tonello F, Dal Molin F, Neri P, Niccolai N, Bracci L: Stable peptide inhibitors prevent binding of lethal and oedema factors to protective antigen and neutralize anthrax toxin in vivo. The Biochemical journal, 395: 157-163 (2006)

79. Popoff M R, Milward F W, Bancillon B, Boquet P: Purification of the Clostridium spiroforme binary toxin and activity of the toxin on HEp-2 cells. Infection and immunity, 57: 2462-2469 (1989)

80. Qa'Dan M, Spyres L M, Ballard J D: pH-induced conformational changes in Clostridium difficile toxin B. Infection and immunity, 68: 2470-2474 (2000)

81. Raetz C R, Whitfield C: Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71: 635-700 (2002)

82. Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schrattenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C: Autocatalytic cleavage of Clostridium difficile toxin B. Nature, 446: 415-419 (2007)

83. Reinert D J, Jank T, Aktories K, Schulz G E: Structural basis for the function of Clostridium difficile toxin B. Journal of Molecular Biology, 351: 973-981 (2005)

84. Roeder M, Nestorovich E M, Karginov V A, Schwan C, Aktories K, Barth H: Tailored cyclodextrin pore blocker protects mammalian cells from clostridium difficile binary toxin CDT. Toxins, 6: 2097-2114 (2014)

85. Schulz-Knappe P, Schrader M, Standker L, Richter R, Hess R, Jurgens M, Forssmann W G: Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. Journal of chromatography.A, 776: 125-132 (1997)

86. 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 pathogens, 5: e1000626 (2009)

87. Seedat J, Marcus U: Aktuelles zur Epidemiologie von *Clostridium difficile*. Epidemiologisches Bulletin Robert-Koch-Institut, 26: 241-244 (2013)

88. 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)

89. Stewart D B, Berg A, Hegarty J: Predicting recurrence of C. difficile colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, 17: 118-24; discussion p.124-5 (2013)

90. Sundriyal A, Roberts A K, Shone C C, Acharya K R: Structural basis for substrate recognition in the enzymatic component of ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from Clostridium difficile. The Journal of biological chemistry, 284: 28713-28719 (2009)

91. Tedesco F J, Barton R W, Alpers D H: Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Annals of Internal Medicine, 81: 429-433 (1974)

92. Tucker K D, Wilkins T D: Toxin A of Clostridium difficile binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. Infection and immunity, 59: 73-78 (1991)

93. Unligil U M, Rini J M: Glycosyltransferase structure and mechanism. Current opinion in structural biology, 10: 510-517 (2000)

94. Vandekerckhove J, Schering B, Barmann M, Aktories K: Clostridium perfringens iota toxin ADP-ribosylates skeletal muscle actin in Arg-177. FEBS letters, 225: 48-52 (1987)

95. von Eichel-Streiber C, Boquet P, Sauerborn M, Thelestam M: Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends in microbiology, 4: 375-382 (1996)

96. von Eichel-Streiber C, Laufenberg-Feldmann R, Sartingen S, Schulze J, Sauerborn M: Comparative sequence analysis of the Clostridium difficile toxins A and B. Molecular & general genetics : MGG, 233: 260-268 (1992)

97. Voth D E, Ballard J D: Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. Clinical microbiology reviews, 18: 247-263 (2005)

98. 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 (London, England), 366: 1079-1084 (2005)

99. Wegner A, Aktories K: ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. The Journal of biological chemistry, 263: 13739-13742 (1988)

100. Wernick N L, Chinnapen D J, Cho J A, Lencer W I: Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. Toxins, 2: 310-325 (2010)

101. White G C,2nd, McMillan C W, Kingdon H S, Shoemaker C B: Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. The New England journal of medicine, 320: 166-170 (1989)

102. 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)

103. 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 research, 25: 157-168 (2015)

104. Zhou K, Wang Y, Gorski J L, Nomura N, Collard J, Bokoch G M: Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc42. The Journal of biological chemistry, 273: 16782-16786 (1998)

105. Zwick M B, Shen J, Scott J K: Phage-displayed peptide libraries. Current opinion in biotechnology, 9: 427-436 (1998)

# III Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Holger Barth für die Einführung in die Welt der Forschung und die Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas. Danke für die exzellente Betreuung, die konstruktive Kritik und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ich danke der gesamten AG Barth - namentlich Christina Förtsch, Katharina Ernst, Leonie Schnell, Ulrike Binder, Stefan Fischer, Volker Hegenauer, Nadja Biber und Amelie Möglich – für die angenehme Arbeitsatmosphäre und produktive Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Professor Thomas Barth für seinen Einsatz als Zweitgutachter, sowie Herrn Professor Daniel Walcher für seine Funktion als Wahlprüfer.

Für die präzise Korrekturarbeit danke ich Hannes Christow, Katharina Esswein und Regine Gauckler.

# IV Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.