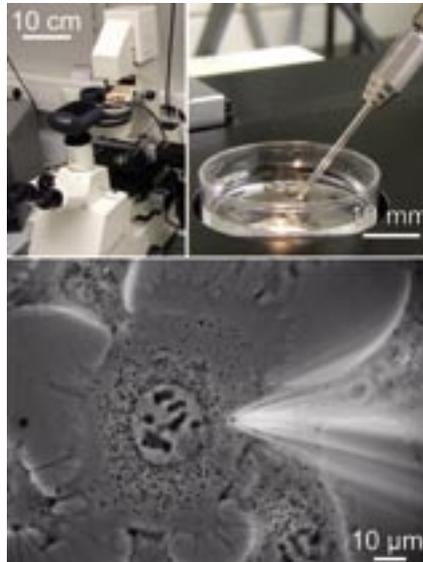


Neuer Aktivierungsmechanismus für ein bakterielles Toxin erforscht

Rudolf Buchheim-Institut für Pharmakologie an „Nature“-Artikel beteiligt – Zusammenarbeit mit Universität Mainz

Wissenschaftler der Johannes Gutenberg-Universität Mainz haben in Zusammenarbeit mit Kollegen aus Gießen, Maribor und der Mainzer Firma Proteosys ein weiteres Rätsel um eine durch Antibiotika hervorgerufene bakterielle Darmerkrankung entschlüsselt, von der jeder betroffen sein kann. Die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppen vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und vom Institut für Immunologie der Universität Mainz in Zusammenarbeit mit dem Rudolf Buchheim-Institut für Pharmakologie der Universität Gießen eröffnen den Zugang zu einer vollkommen neuen Form der Behandlung von Antibiotika-assoziiierter Colitis. Das Wissenschaftsjournal „Nature“ publizierte in seiner Ausgabe vom 22. März 2007 die Ergebnisse in Form eines „Article“. Gießener Forscher haben dabei einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des bislang unbekanntes Mechanismus dieser infektiösen Darmerkrankung geleistet.

Die Antibiotika-assoziierte Colitis wird von einem verbreitet vorkommenden Darmbakterium, dem *Clostridium difficile*, hervorgerufen, das etwa 1-4 % aller Menschen in ihrem Dickdarm mit sich tragen. Krankenhauspatienten sind sogar zu 20 bis 40 % damit infiziert. Üblicherweise wird die Massenvermehrung von *Clostridium difficile* aber durch die Überzahl anderer gutartiger Bakterien im Darm verhindert, so dass die Infekti-



Größenvergleich: Mikroskop und Teil der Mikroinjektionsanlage, Kulturschale mit Zellen und der Glas-Mikroinjektionspipette, Zelle mit Spitze der Mikroinjektionspipette

on nicht zum Ausbruch kommt. Insbesondere durch eine Antibiotikatherapie können aber die gutartigen Darmbakterien so stark geschädigt werden, dass es dann doch zu einer explosionsartigen Vermehrung der recht resistenten Clostridien kommen kann. Dadurch steigt auch die Konzentration der von diesen Bakterien ständig ausgeschiedenen „Toxine“ im Darm an. Diese Toxine, deren wissenschaftliche Bezeichnung TcdA und TcdB für Toxin *Clostridium difficile* A bzw. B ist, sind komplexe Protein-

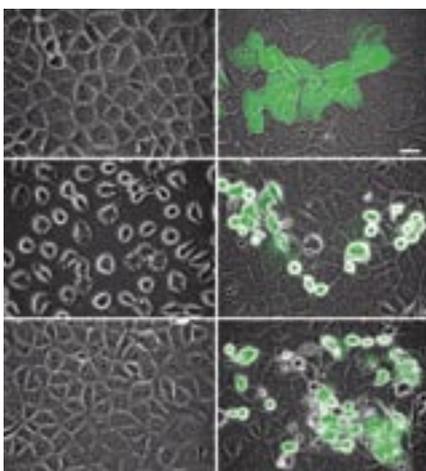
strukturen. Wenn sie in die Zellen der Dickdarmwand gelangen, wirken sie als Zellgifte und verursachen Funktionsstörungen der Zellen bis hin zu deren Absterben. Für die Erkrankten äußert sich dies zunächst als Durchfall bis hin zu blutig-schleimigen Stühlen.

Das Bakterium galt bislang als relativ harmlos und führte nur in seltenen Fällen zu tödlichen Komplikationen. Seit etwa 2002 häufen sich jedoch Berichte über eine genetische Veränderung des Bakteriums, die dazu führt, dass es deutlich aggressiver wirkt. Zudem scheint es wesentlich resistenter gegen die üblicherweise eingesetzten Medikamente zu sein. Nachdem 2004 in den USA und Kanada mehrere hundert Menschen an einer Infektion mit dieser aggressiveren Variante gestorben sind, wurden 2006 auch 25 Todesfälle in Großbritannien und den Niederlanden bekannt. Wissenschaftler schätzen, dass eine Infektion mit dieser neuen Variante in etwa 7 % aller Fälle zum Tode führt, wobei die Todesrate bei älteren Menschen sogar auf etwa 15 % ansteigt. Verursacht wird die erhöhte Gefährlichkeit dieser neuen Bakterienvariante durch eine bis zu 23-fach erhöhte Ausscheidung der für die Darmzellen tödlichen Bakterientoxine.

Aufklärung des Aktivierungsmechanismus

In diesem Zusammenhang ist es verständlich, das Forscher stark daran inte-

Fortsetzung auf Seite 59



Linke Spalte von oben nach unten: (1) Kontrolle normal wachsende Zellen, (2) Zellen mit extrazellulär appliziertem Toxin, (3) Zellen mit extrazellulär appliziertem veränderten Toxin: Nur die Zellen mit dem unveränderten Toxin zeigen die typischen toxininduzierten morphologischen Veränderungen.

Rechte Spalte von oben nach unten, alle grün eingefärbten Zellen wurden injiziert: (1) Kontrollinjektion mit Trägerlösung und Farbstoff, der Größenmarker (liegender Balken) entspricht 20 μm. (2) injiziertes normales Toxin, (3) injiziertes verändertes Toxin.

Die Kontrolle zeigt, dass die Injektion an sich sowie der Farbstoff (FITC-Dextran) unschädlich für die Zellen sind. Dagegen führt die Injektion des nativen sowie des veränderten Toxins jeweils zur typischen Abrundung der Zellen. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung des autokatalytischen Zentrums zwar die normale Aufnahme des Toxins in das Cytosol verhindert, grundsätzlich die Funktion als Zellgift bei Injektion ins Cytosol jedoch nicht beeinträchtigt. Weiterführend war dies zusammen mit den Daten aus anderen Experimenten der Beweis für den bis dahin unbekanntes Mechanismus der autokatalytischen Abspaltung des eigentlich zellgiftigen Molekülbestandteils aus dem Gesamt-Toxinmolekül.

Fortsetzung von Seite 3

ressiert sind herauszufinden, wie genau diese bakteriellen Toxine in die Zellen gelangen und vor allem, wie sie aktiviert werden. Ursprünglich besteht das von den Bakterien ausgeschiedene Toxin aus mindestens drei aneinanderhängenden Funktionsgruppen eines langen Proteinmoleküls, die alle eine bestimmte Aufgabe erfüllen. Nur ein kleiner Teil des gesamten Moleküls ist die eigentlich als Zellgift wirkende Funktionsgruppe. Sie muss, um in der Zelle wirksam werden zu können, zunächst mit dem vollständigen Molekül von der Zelle aufgenommen werden und darf erst im Zellinneren, dem so genannten „Cytosol“, vom gesamten Molekül abgespalten werden. Der Rest des Moleküls bleibt, nachdem es seine Aufgaben erledigt hat, im „Endosom“ oder „Lysosom“, dem Verdauungssystem der Zelle, stecken und wird dort abgebaut.

Wie diese Abspaltung vor sich geht war bislang noch nicht bekannt. Deswegen haben Mitarbeiter der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Christoph von Eichel-Streiber und Prof. Dr. Hansjörg Schild der Universität Mainz versucht, diese Frage zu klären. Zwei Mitarbeitern dieser beiden Arbeitsgruppen, Dipl. Biol. Jessica Reinecke und Dr. Stefan Tenzer, gelang es dann durch analytische Methoden, den in den Zellen vorhandenen „Aktivator“, der für die Abspaltung des eigentlich giftigen kleineren Bruchstücks des Moleküls verantwortlich ist, zu finden. Überraschenderweise und im Gegensatz zur bisher weit verbreiteten Meinung handelte es sich dabei allerdings nicht um eine Körper- bzw. zelleigene Protease (ein Enzym, das Proteine – also auch das Toxin – spalten kann), sondern um ein sehr kleines und in den Zellen häufig vorkommendes Molekül, das

Inositol-6-Phosphat. Dieses Molekül hat keine eigene spaltende Wirkung, sondern es aktiviert wiederum einen Teil des Toxinmoleküls, der daraufhin selbst den Rest seines eigenen Moleküls abspaltet, so dass er als Zellgift aktiv werden kann. Wissenschaftlich bezeichnet man diesen Vorgang der „Selbstspaltung“ als Autoproteolyse.

Die für eine lückenlose Beweisführung noch ausstehenden Untersuchungen an lebenden Zellen wurden dann von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dreyer, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Universität Gießen, durchgeführt. Dazu musste das Toxin und eine abgewandelte Form davon durch Mikroinjektion künstlich in die Zelle eingebracht und die Wirkung beobachtet werden. Dr. Andreas Koschinski konnte mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik und einer Kombination aus Normaloptischer- und Fluoreszenzmikroskopie die letzten Beweise dafür erbringen, dass das Toxin tatsächlich eine Inositolphosphat-induzierte autoproteolytische Aktivität besitzt und keine zelleigene Protease an der Freisetzung der katalytischen Untereinheit beteiligt ist. Das bedeutet, das von *Clostridium difficile* ausgeschiedene große Toxinmolekül spaltet sich also im Gegensatz zur gängigen Lehrmeinung unter Einfluss eines in den Zellen vorkommenden kleinen Moleküls selbst und benötigt kein weiteres zelleigenes Enzym zur Freisetzung des eigentlich giftigen kleineren Bruchstücks. Dies ist das erste Mal, dass ein solcher Mechanismus für ein bakterielles Toxin gezeigt werden konnte.

Klinische Relevanz dieser Ergebnisse

Dieses Ergebnis ist einer der wenigen Glücksfälle, in denen sich eine aus der

universitären Grundlagenforschung gewonnene Erkenntnis fast direkt in ein Therapiekonzept umsetzen lässt. So ist es denkbar, dass man in Zukunft die Auswirkungen einer Clostridieninfektion einfach durch die Einnahme einer Pille, die Inositol-6-phosphat enthält, beheben kann. Das Inositol-6-phosphat würde dann eine Spaltung des gesamten Toxinmoleküls noch außerhalb der Darmzellen bewirken, woraufhin der eigentlich zellgiftige kleinere Teil des Toxins nicht mehr in die Zelle gelangen kann, sondern einfach abgebaut wird. Da außerdem Inositol-6-Phosphat eine in Körperzellen natürlich vorkommende Substanz ist und die zur Aktivierung des Toxins notwendige Konzentration sehr niedrig ist, würde man zunächst auch wenig Nebenwirkungen erwarten. Im Laufe der Zeit würden sich dann die normalen, gutartigen Darmbakterien wieder vermehren und die Clostridien in ihrer Vermehrung unterdrücken. Das wäre ein eleganter alternativer Therapieansatz, um ohne den Einsatz der wenigen noch gegen Clostridien wirksamen Antibiotika eine solche Infektion selektiv zu bekämpfen.

Die Bedeutung dieser Entdeckung hat sich auch darin gezeigt, dass die international renommierte Fachzeitschrift „Nature“ die Ergebnisse dieser Untersuchung als fünfseitigen Artikel veröffentlicht hat. Dieser Artikel mit dem Titel: „Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* Toxin B“ von Jessica Reinecke, Stefan Tenzer, Maja Rupnik, Andreas Koschinski, Oliver Hasselmayer, André Schrattenholz, Hansjörg Schild und Christoph von Eichel-Streiber ist am 5. März 2007 zunächst online (doi:10.1038/nature05622) und am 22. März auch in gedruckter Form erschienen (Nature 2007, Vol 446, 415-419).