

## LC-MS-basierte Analysen

# *Clostridioides difficile*-Toxine verändern das Proteom von Darmzellen

ANDREAS PICH<sup>1</sup>, JOHANNES JUNEMANN<sup>2</sup>, FLORIAN STIEGLITZ<sup>1</sup>,  
THERESA SCHWEITZER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE, RESEARCH CORE FACILITY PROTEOMICS,  
MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER

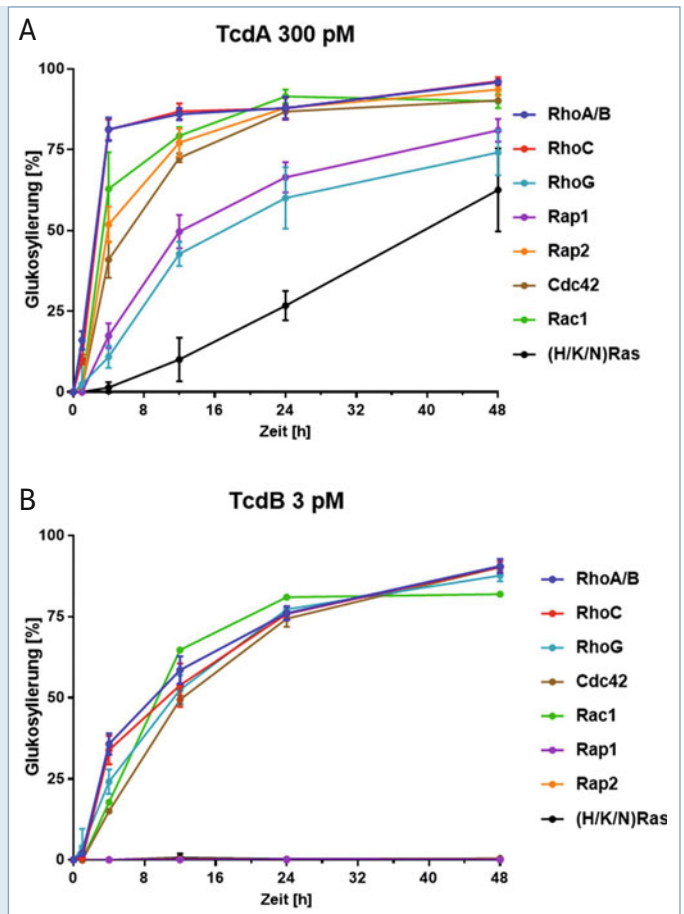
<sup>2</sup> QUALITY SERVICES INTERNATIONAL GMBH, BREMEN

**Toxins produced by *Clostridioides difficile* inactivate small GTPases leading to reorganization of cellular processes, cell death, and in the worst case death of patients. We explore the molecular effects of these toxins on target cells using LC-MS-based proteome and phosphoproteome techniques. Sample preparation with extensive fractionation is highly important for LC-MS-based studies to increase depths of proteome coverage and affinity chromatography is crucial to detect as many phosphopeptides as possible.**

DOI: 10.1007/s12268-019-0213-0  
© Springer-Verlag 2019

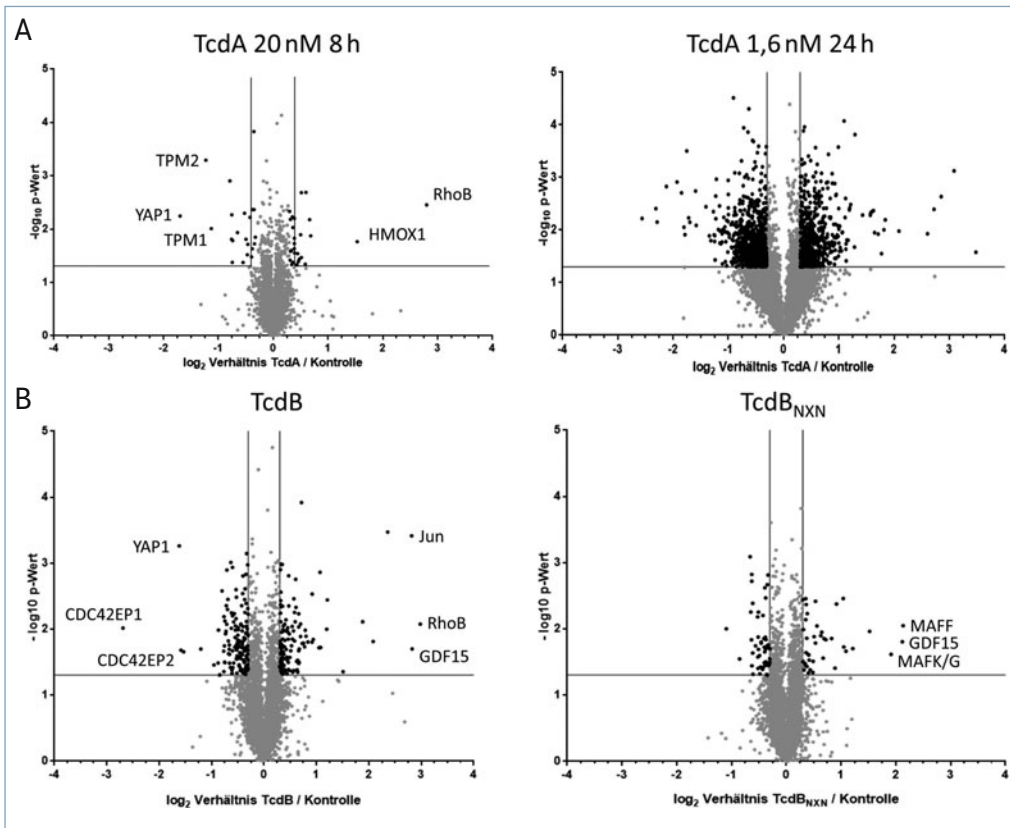
Der Gram-positive Anaerobier *Clostridioides difficile* (ehemals *Clostridium difficile*) ist der Erreger einer hauptsächlich nosokomial übertragenen Darminfektion (*C. difficile*-Infektion, CDI), deren Verläufe von der selbstlimitierenden Durchfallerkrankung bis zur schweren pseudomembranösen Colitis reichen. In der Bundesrepublik Deutschland wurden in den Jahren 2013 und 2014 über 100.000 Fälle registriert; je nach Studie liegt die Mortalität zwischen zwei und 30 Prozent. Insbesondere nach Schädigung der normalen Darmflora, z. B. durch eine Antibiotikatherapie, kann sich *C. difficile* im Darm vermehren und das Colonepithel zerstören [1, 2]. Hauptpathogenitätsfaktoren sind die beiden großen, glucosylierenden Toxine TcdA (308 kDa) und TcdB (270 kDa), die durch rezeptorvermittelte Endocytose in die Darmzellen aufgenommen werden [3]. Der N-Terminus beider Toxine umfasst eine Glucosyltransferase-Domäne, die mit dem Ko-Substrat UDP-Glucose die Glucosylierung kleiner GTPasen, wie Rho und Ras, an einem Threoninrest katalysiert [4, 5]. Dadurch werden diese wichtigen Regulatoren inaktiviert, was eine Reorganisation des Cytoskeletts auslöst, sodass die Zellen ihre Form verlieren und sich

► **Abb. 1:** Glucosylierungskinetik kleiner GTPasen durch TcdA und TcdB. Epitheliale Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten mit TcdA (A) bzw. TcdB (B) behandelt. Die Proteine wurden extrahiert, verdaut und die glucosylierten Peptide und ihre nicht-modifizierten Gegenstücke quantifiziert (weitere Details siehe Text) [8].



abrunden. Weitere zelluläre Prozesse werden gestört, und letztendlich sterben die Zellen. Anhand von Untersuchungen des Proteoms vergifteter Zellen konnte gezeigt werden, dass neben den kleinen GTPasen noch weitere zelluläre Regulatorproteine durch die Toxine beeinflusst werden und wichtige Prozesse, wie Zellzyklus, Homöostase von Ribosomen und Mitochondrien, die Reaktion auf oxidativen Stress sowie die Ausbildung von Zelladhäsionen und *Tight Junctions*, geschädigt werden [6, 7].

Ein entscheidender Punkt für die Wirkung der Toxine ist die Glucosylierung der kleinen GTPasen. Diese konnte bereits Ende des letzten Jahrhunderts nachgewiesen werden [4, 5]. Zur Analytik der Glucosylierung wurden radioaktive Assays bzw. Tests mit glucosylier-



◀ **Abb. 2:** Proteomanalysen nach Behandlung mit TcdA und TcdB, dargestellt im Volcano-Plot. Die Veränderungen im Proteom von epithelialen Zellen wurden nach Behandlung mit TcdA (A) und TcdB (B) gemessen. Für TcdA sind zwei Zeitpunkte bei unterschiedlichen Toxinkonzentrationen gezeigt. Bei TcdB ist auf der linken Seite der Einfluss von Glucosyltransferase-aktivem TcdB und auf der rechten Seite der Einfluss von Glucosyltransferase-inaktivem TcdB (TcdB<sub>NXN</sub>) dargestellt. Die Punkte repräsentieren die Intensitätsverhältnisse einzelner Proteingruppen zwischen behandelt und unbehandelt. Einige Proteinennamen sind angegeben [6, 10].

rungsspezifischen Antikörpern verwendet. Aussagen ließen sich also nur *in vitro* oder für die GTPasen Rac und Ras machen, für die geeignete Antikörper zur Verfügung stehen. Mittlerweile ist aber auch ein *multiple reaction monitoring* (MRM)-basierter Ansatz für den spezifischen und gerichteten *in vivo*-Nachweis der Glucosylierung etabliert, wobei in einer Messung die Glucosylierung mehrerer GTPasen bestimmt werden kann [8, 9]. Die Quantifizierung des Glucosylierungsgrades erfolgt mit einem internen Standard. Dazu werden schwere, mit stabilen Isotopen markierte, glucosylierte und nicht-glucosylierte GTPasen verwendet. Nach Behandlung von Colonzellen mit TcdA konnte für elf GTPasen eine Glucosylierung nachgewiesen werden (**Abb. 1A**); TcdB hat ein anderes Glucosylierungsprofil und ist nicht in der Lage, die GTPasen (H/K/N)Ras und Rap1/2 zu glucosylieren (**Abb. 1B**). In Abhängigkeit von der eingesetzten Toxinmenge werden die GTPasen mit unterschiedlichen Raten modifiziert. Bei 300 pM TcdA sind RhoABC, Rac1, Rap2 und Cdc42 nach ca. drei Stunden zu mehr als 50 Prozent glucosyliert; Rap1, RhoG und (H,K,N)Ras sind nach dieser Zeit nur zu maximal zehn Prozent modifiziert. Für TcdB ist in **Abbildung 1** eine geringere Menge an Toxin (3 pM) eingesetzt worden, bei der erst nach etwa zehn bis zwölf Stunden der Anteil der

glucosylierten GTPasen bei ca. 50 Prozent lag. TcdB ist im Vergleich zu TcdA um ein Vielfaches potenter, weshalb die Glucosylierungsrate bei äquimolaren Mengen im Vergleich zu TcdA deutlich höher gewesen wäre.

Da es sich bei TcdA und TcdB um komplexe Toxine mit einem mehrstufigen Aufnahmeprozess handelt, ist die Kinetik der Glucosylierung nicht nur von der Spezifität und Aktivität der Glucosylierungsdomäne abhängig, sondern wird auch durch die Geschwindigkeit der Einschleusung in die Zelle beeinflusst. Die Menge der Toxine und die Behandlungsdauer der Zellen mit den Toxinen ist ebenfalls entscheidend für die Auswirkungen auf zelluläre Prozesse (**Abb. 2A**). Alle Wirkungen von TcdA auf Zielzellen hängen von der Glucosyltransferase-Domäne ab. Wird eine Glucosyltransferase-inaktive Mutante von TcdA verwendet, die rekombinant hergestellt werden kann, lassen sich weder morphologische Veränderungen noch Unterschiede im Proteom nachweisen [10]. Im Gegensatz dazu hat eine Glucosyltransferase-negative Mutante von TcdB einen deutlichen Effekt auf die Morphologie und das Proteom epithelialer Zellen, der bei höheren Toxinkonzentrationen stärker ausgeprägt ist (**Abb. 2B**). Glucosyltransferase-defizientes TcdB induziert eine Chromatinkondensation und das Aufblähen der Plasmamembran und Kernhülle, was als Pykno-

se bezeichnet wird. Die morphologischen Änderungen werden von einer erhöhten ROS (*reactive oxygen species*)-Produktion begleitet. Biochemische und Proteom-Daten legen nahe, dass CYR61, YAP1 und Rac daran beteiligt sind [6]. Wird Glucosyltransferase-aktives TcdB zu Zellen gegeben, konkurrieren beide Prozesse miteinander und der Anteil der pyknotischen Zellen nimmt mit der Menge des eingesetzten TcdB zu.

### Phosphoproteomics

Für Proteine sind ungefähr 400 verschiedene posttranslationale Modifikationen (PTM) beschrieben, von denen die Phosphorylierung am intensivsten untersucht und am besten verstanden ist [11]. Phosphorylierungen von Proteinen spielen eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Weitergabe von Signalen. Spezifische Kinasen und Phosphatasen können den Phosphorylierungsstatus von regulatorischen Proteinen schnell verändern, sodass Zellen innerhalb von Minuten auf intra- und extrazelluläre Stimuli reagieren und ihre Physiologie an die Bedürfnisse anpassen können [12]. Regulation kann auch durch die Änderung der Abundanz von Proteinen erfolgen, allerdings laufen diese Veränderungen deutlich langsamer ab und benötigen in der Regel mehrere Stunden. Wurden früher Phosphorylierungen vor allem mit radioaktiven

Methoden nachgewiesen, gibt es heute eine große Anzahl von Antikörpern, die spezifisch Phosphorylierungsstellen detektieren und den Phosphoryierungsgrad ermitteln können. In den letzten Jahren wurden zunehmend Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)-basierte Techniken eingesetzt, mit denen durch gerichtete Ansätze (MRM) individuelle Phosphorylierungsstellen spezifisch nachgewiesen und bei Verwendung von AQUA-Peptiden als interner Standard absolut quantifiziert werden können. Mit *bottom-up Proteomics* und *data-dependent acquisition* (DDA)-MS-Techniken kann das komplexe Phosphoproteom einer Zelle oder eines Gewebes abgebildet werden. In einer Analyse lassen sich so mehrere Tausend Phosphorylierungsstellen nachweisen und relativ zueinander in verschiedenen Proben quantifizieren.

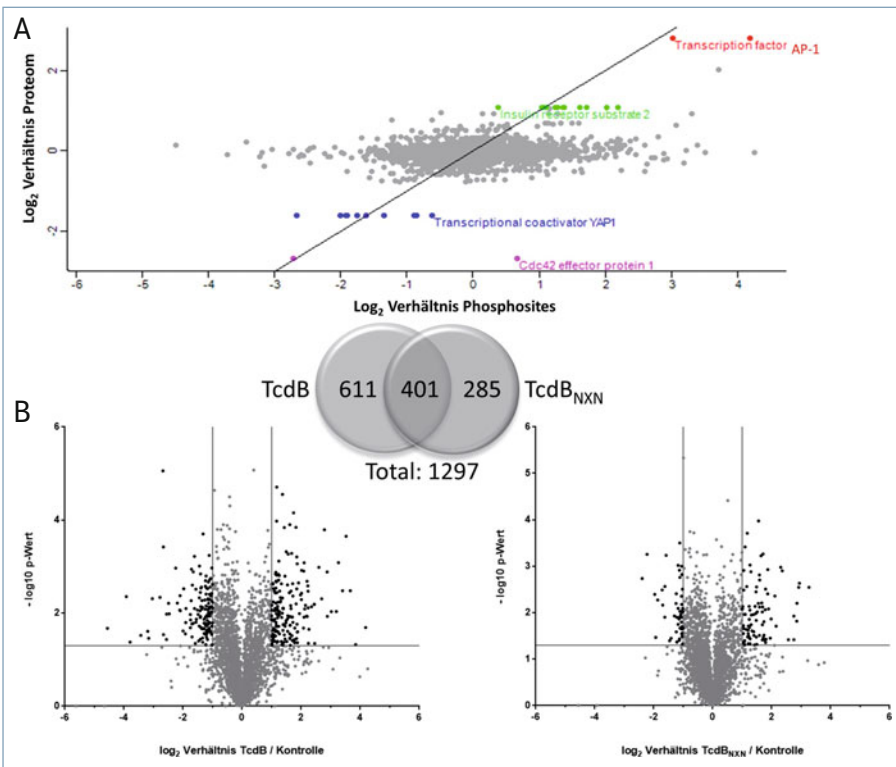
Für *Phosphoproteomics* ist es zwingend erforderlich, dass die Phosphopeptide zunächst angereichert werden, da sie nur einen geringen Teil aller Peptide ausmachen [13]. Erfreulicherweise verleiht die Phosphorylierung Peptiden besondere Eigenschaften, die man sich bei der Anreicherung zunutze machen kann, und inzwischen gibt es eine ganze Reihe geeigneter, kommerziell erhältlicher Chromatographiematerialien. Die Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) z. B. mit immobilisiertem Eisen, die Metalloxid-Affinitätschromatographie (MOAC) mit  $\text{TiO}_2$  und die starke Kationenaustauschchromatographie (SCX) stellen die gängigsten Verfahren dar. Jedes Material hat seine Vorteile, so eignet sich  $\text{TiO}_2$  eher für einfach phosphorylierte Peptide, während IMAC-Fe gut für mehrfach phosphorylierte Peptide angewandt werden kann. Beide Techniken binden Phosphopeptide mit hoher Spezifität. Mit SCX-Materialien können Phosphopeptide ebenfalls aufgrund ihrer Ladung

bei niedrigem pH-Wert (2,65) spezifisch angereichert werden. Bei der SCX werden noch weitere, nicht-phosphorylierte Peptide gebunden, die durch eine geeignete Fraktionierung abgetrennt werden können. Idealerweise werden diese Methoden kombiniert, um den Anreicherungsgrad und die Anzahl der nachgewiesenen Phosphopeptide in einer Probe zu erhöhen. Für Phosphopeptidmessungen in einem Massenspektrometer (MS) sind dessen Einstellungen ebenso wichtig. In erster Linie werden Fragmentierungstechniken wie *higher-energy collisional dissociation* (HCD) mit für die Probe optimierten Einstellungen verwendet, was qualitativ und quantitativ sehr gute Ergebnisse liefert. Eine weitere Methode ist die  $\text{MS}^3$ -Messung. Diese sehr spezifische, aber für einen DDA-Ansatz relativ langsame Methode nutzt die Abspaltung der Orthophosphorsäure von Serin- und Threoninresten in Phosphopeptiden bei der *collisional induced dissociation* (CID). Dadurch entsteht ein Signal für einen Neutralverlust von 98 Dalton und oft kaum weitere Fragmentationen, sodass keine Datenbanksuche zur Sequenzbestimmung möglich ist. Daher wird dieses um 98 Dalton kleinere Neutralverlustfragment des Vorläuferpeptids erneut im MS isoliert und fragmentiert ( $\text{MS}^3$ ), wodurch weitere Peptidfragmente für die Datenbanksuche erzeugt werden und die Peptidsequenz sicher identifiziert werden kann [14]. Bei Tyrosinphosphorylierungen entsteht dieser Neutralverlust nicht. Hier tritt in der  $\text{MS}^2$ -Analyse der Muttermasse ein charakteristisches Immoniumion mit  $m/z$  von 216 auf, das für den Nachweis verwendet werden kann. Aminosäurereste, denen Phosphatgruppen zugeordnet werden können, werden als Phosphosite bezeichnet. Wenn die Sicherheit der Lokalisierung 75 Prozent übersteigt, gilt sie als eindeutig identifiziert.

Die Wirkung des *C. difficile*-Toxins TcdB auf das Phosphoproteom wurde in einem Pilotexperiment mit einer epithelialen Zelllinie untersucht [15]. Nach der Behandlung der Zellen mit dem Glucosyltransferase-aktiven und -inaktiven Toxin wurden die Proteine extrahiert, verdaut und das Peptidgemisch mittels SCX fraktioniert. Aus den einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss mit IMAC und MOAC die Phosphopeptide angereichert und mittels LC-MS gemessen. Mithilfe einer  $\text{MS}^3$ -LC-MS-Methode konnten nach Datenbankanalyse und Quantifizierung insgesamt 4.433 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, von denen 1.297 durch den Einsatz der Toxine verändert waren. Das Glucosyltransferase-aktive TcdB veränderte 1.012 und das Glucosyltransferase-inaktive TcdB 686

Phosphorylierungsstellen, bei einer Überlappung von 401 Stellen (**Abb. 3A**). Durch eine mit denselben Proben durchgeführte Proteomanalyse wurden die Intensitäten der quantitativ veränderten Phosphorylierungsstellen korrigiert (**Abb. 3B**). TcdB verursachte eine größere Anzahl an heraufregulierten Phosphorylierungsstellen, von denen die am stärksten regulierten Stellen in GTPase-Effektorproteinen (z. B. Arhgef2, Dock5) zu finden sind. Auch Phosphorylierungsstellen im Transkriptionsfaktor AP-1, die durch den p38- und JNK-Signalweg im Zusammenhang mit Stress und Apoptose aktiviert werden, wurden durch TcdB heraufreguliert.

Wie bei den Proteomanalysen konnten auch durch die Verwendung der Glucosyltransferase-inaktiven Mutante von TcdB deut-



▲ **Abb. 3:** Veränderungen im Phosphoproteom nach Behandlung mit TcdB (A). Abundanz verschiedener Phosphoproteine sowie die dazugehörige Abundanz der Phosphosites. Anzahl signifikant veränderter Phosphosites nach Behandlung mit TcdB bzw. der Glucosyltransferase-negativen Mutante (TcdBNXN) im Vergleich (B). Die Punkte repräsentieren die Intensitätsverhältnisse einzelner Proteingruppen zwischen behandelt und unbehandelt. Einige Proteinennamen sind angegeben [15].

liche Veränderungen im Phosphoproteom festgestellt werden. Vor allem Regulatoren für das Cytoskelett und die Zellproliferation (z. B. PP1R12A, SRSF2) waren betroffen. Herunterreguliert war z. B. die Phosphorylierungsstelle im ribosomalen Protein S6, das am Zellwachstum beteiligt ist und bei einem Wachstumsstopp dephosphoryliert wird.

Diese vorläufigen Daten zeigen, dass TcdB von *C. difficile* auch starke Veränderungen im

Phosphoproteom von Zielzellen bewirkt. Weitere Studien werden derzeit in unserem Labor durchgeführt; sie sollen diese Ergebnisse bestätigen und weitere Details, insbesondere nach sehr kurzen Behandlungszeiten, aufdecken.

### Literatur

[1] Robert-Koch-Institut (2017) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016, www.rki.de/

DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\_2016.pdf?sessionid=9155FBC797128843153456100CEA8098.2\_cid381?\_blob=publicationFile

- [2] Lübbert C, Zimmermann L, Borchert J et al. (2016) Epidemiology and recurrence rates of *Clostridium difficile* infections in Germany: a secondary data analysis. *Infect Dis Ther* 5:545–554
- [3] Aktories K, Schwan C, Jank T (2017) *Clostridium difficile* toxin biology. *Annu Rev Microbiol* 71:281–307
- [4] Just I, Wilm M, Selzer J et al. (1995) The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 270:13932–13936
- [5] Just I, Selzer J, Wilm M et al. (1995) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375:500–503
- [6] Erdmann J, Junemann J, Schröder A et al. (2017) Glucosyltransferase-dependent and -independent effects of TcdB on the proteome of HEp-2 cells. *Proteomics* 17, doi: 10.1002/pmic.201600435
- [7] Zeiser JJ, Klodmann J, Braun H-P et al. (2011) Effects of *Clostridium difficile* toxin A on the proteome of colonocytes studied by differential 2D electrophoresis. *J Proteomics* 75:469–479
- [8] Junemann J, Lämmerhirt CM, Polten F et al. (2017) Quantification of small GTPase glucosylation by clostridial glucosylating toxins using multiplexed MRM analysis. *Proteomics* 17, doi: 10.1002/pmic.201700016
- [9] Genth H, Junemann J, Lämmerhirt CM et al. (2018) Difference in mono-O-glucosylation of Ras subtype GTPases between toxin A and toxin B from *Clostridioides difficile* strain 10463 and lethal toxin from *Clostridium sordellii* strain 6018. *Front Microbiol* 9:3078
- [10] Junemann J, Birgin G, Erdmann J et al. (2017) Toxin A of the nosocomial pathogen *Clostridium difficile* induces primary effects in the proteome of HEp-2 cells. *Proteomics Clin Appl* 11, doi: 10.1002/prca.201600031
- [11] Pawson T, Scott JD (2005) Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30:286–290
- [12] Dengjel J, Akimov V, Olsen JV et al. (2007) Quantitative proteomic assessment of very early cellular signaling events. *Nat Biotechnol* 25:566–568
- [13] Doll S, Gnad F, Mann M (2019) The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine. *Proteomics Clin Appl* 13, doi: 10.1002/prca.201800113
- [14] Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR (2009) Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 44:861–878
- [15] Junemann J, Just I, Gerhard R et al. (2018) Quantitative phosphoproteome analysis of *Clostridioides difficile* toxin B treated human epithelial cells. *Front Microbiol* 9:3083

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Andreas Pich  
Institut für Toxikologie  
Core Facility Proteomics  
Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Straße 1  
D-30625 Hannover  
Tel.: 0511-532-2808  
Pich.Andreas@mh-hannover.de

### AUTOREN



#### Andreas Pich

Jahrgang 1961. Biologiestudium in Göttingen. 1991 Promotion, 1992–1994 Postdoc am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle. 1994–2001 Arbeitsgruppenleiter am Institut für Mikrobiologie der MLU Halle. 2001–2009 Leiter Core Facility Proteomics und Arbeitsgruppenleiter am Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover; dort seit 2009 Professur für Proteomics und Toxikologie.



#### Johannes Junemann

Jahrgang 1986. 2007–2014 Pflanzenbiotechnologiestudium (B. Sc. und M. Sc.) in Hannover. Seit 2018 Doktorand und Postdoc in der Core Facility Proteomics am Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover. Seit 2018 Laborleiter bei Quality Services International GmbH, Bremen.



#### Florian Stieglitz

Jahrgang 1994. 2014–2016 Biologiestudium (B. Sc.) in Gießen. 2016–2018 Biomedizinstudium (M. Sc.) in Hannover. Seit 2019 Doktorand in der Core Facility Proteomics am Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover.



#### Theresa Schweitzer

Jahrgang 1994. 2012–2015 Studium Naturwissenschaftliche Forensik (B. Sc.) in Rheinbach. 2015–2017 Analytikstudium (M. Sc.) in Hannover. Seit 2018 Doktorandin in der Core Facility Proteomics am Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover.