

Young Scientist Merck Award 2017 der Deutschen Gesellschaft für Toxikologie für Dr. Katharina Ernst

Katharina Ernst, geboren 1986 in Warburg, hat ihr Diplom in Biologie 2011 an der Universität Ulm erhalten. Seit dem erfolgreichen Abschluss ihrer Doktorarbeit 2015 unter Anleitung von Prof. Dr. Holger Barth am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Ulm verfolgt Katharina Ernst ihre Forschungsarbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin weiterhin in der Arbeitsgruppe Barth. Sie ist Mitglied im Ulmer Sonderforschungsbereich 1149 „Gefahrenantwort, Störfaktoren und regeneratives Potential nach akutem Trauma“, in der deutschen Gesellschaft für Toxikologie sowie deren Arbeitskreis „biogene Toxine“ und nimmt am Weiterbildungsprogramm „Fachtoxikologe/in DGPT“ teil. Ihre Forschungsarbeit wird unterstützt durch die Startförderung „Bausteinprojekt 3.2“ der medizinischen Fakultät der Universität Ulm.

Der mit 2500 Euro dotierte Young Scientist Merck Award wird von der Firma Merck gestiftet und jährlich von der Deutschen Gesellschaft für Toxikologie an Nachwuchswissenschaftler für herausragende Arbeiten im Bereich der toxikologischen Forschung vergeben. Dr. Ernst erhielt diesen Preis während der Jahrestagung der DGPT 2017 in Heidelberg für ihre neuen Ergebnisse zur Rolle von Wirtszellchaperonen und Faltungshelferenzymen bei der Aufnahme ADP-ribosylierender Bakterientoxine in das Zytoplasma von Säugetierzellen.

Bakterielle ADP-ribosylierende Toxine (ADP-RTs) vom AB-Typ verursachen schwerwiegende Krankheiten wie Diphtherie, Keuchhusten oder *Clostridium (C.) difficile*-assoziierte Darmerkrankungen (z.B. Pseudomembranöse Colitis). Die Bindungs-/Translokationsdomäne (B-Domäne) dieser AB-Toxine ermöglicht dabei die Rezeptor-vermittelte Endozytose des Toxins und anschließend durch Bildung einer Pore in die Endosomenmembran den Transport der entfalteten Enzymdomäne (A-Domäne) in das Zytoplasma der Zielzelle. Im Zytoplasma überträgt die A-Domäne einen ADP-Riboserest aus dem Co-Substrat NAD⁺ kovalent auf ein spezifisches Substratmolekül. Dies führt zu Veränderungen bzw. Beeinträchtigungen zellulärer Funktionen und löst somit die entsprechenden klinischen Symptome aus.

Der Fokus der Forschung in der Ulmer Arbeitsgruppe von Professor Holger Barth liegt auf den clostridialen binären Enterotoxinen, die globuläres Aktin ADP-ribosylieren. Dies führt zu einer vollständigen Depolymerisierung des filamentösen Aktins und somit zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts. Diese Enterotoxine, zu denen auch das CDT-Toxin von *C. difficile* gehört, entfalten ihre zytotoxische Wirkung im Darm und führen so zum Verlust der Barrierefunktion. Die gestörte Darmbarriere wiederum ermöglicht eine erleichterte Besiedlung durch die Toxin-produzierenden Bakterien und somit zu Infektionen mit zum Teil schwerem klinischen Verlauf (Gerding et al., 2014). Die Aufnahme der A-Domäne in das Zytoplasma der Zielzelle stellt hierbei einen entscheidenden Schritt dar. In den letzten Jahren konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die erfolgreiche Aufnahme der A-Domäne in das Zytoplasma nicht nur von der B-Domäne abhängt, sondern zudem die Aktivität der Wirtszellchaperone Hsp70 und Hsp90, sowie Proteinfaltungshelferenzyme aus der Familie der Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerasen (PPIasen) benötigt werden (Barth and Ernst, 2016). Durch *in vitro* Methoden wie Dot-Blot-Analyse, Co-Präzipitationen und isothermale Titrationskalorimetrie konnte die Interaktion zwischen Wirtszellfaktoren und bakteriellen A-Domänen charakterisiert und dabei Hsp90, Hsp70, sowie Isoformen der PPIase-Familien der Cyclophiline (Cypps) und FK506-Bindeproteine (FKBPs) als neue direkte Interaktionspartner ADP-ribosylierender Toxine identifiziert werden (Barth and Ernst, 2016; Ernst et al., 2015, 2016; Kaiser et al., 2012). Diese Interaktion konnte zudem erstmals in lebenden Zellen durch den Fluoreszenz-basierten Proximity Ligation Assay (PLA) gezeigt werden (Ernst et al., in Revision). Wird die Aktivität von Hsp90, Hsp70,

Cyps oder FKBP durch spezifische pharmakologische Inhibitoren in kultivierten Zellen gehemmt, zeigt sich eine deutliche Hemmung der Intoxikation durch ADP-RTs (Barth and Ernst, 2016).

Die neuesten Ergebnisse von Katharina Ernst zeigen, dass eine Hemmung der Hsp70-Aktivität nicht nur kultivierte Zellen sondern auch aus Stammzellen induzierte humane Darmorganoide, sogenannte Miniguts, vor einer Vergiftung mit dem CDT-Toxin schützen (Ernst et al., in Revision). Diese Miniguts weisen typische Merkmale eines menschlichen Darmgewebes wie Krypten-ähnliche Strukturen auf und stellen daher ein interessantes Modell für die Untersuchung von Enterotoxinen dar. Des Weiteren deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Beteiligung von Hsp90/Hsp70/PPIasen ein gemeinsames Merkmal ADP-ribosylierender Toxine darstellt, zu denen weitere humanmedizinisch relevante Toxine wie z.B. das *Bordetella pertussis* Toxin (Auslöser des Keuchhustens) oder das Diphtherietoxin gehören (Lang et al., 2014; Schuster et al., 2017; Ernst et al. in Revision). Die zukünftige Forschung wird sich dem zugrunde liegenden Mechanismus der Interaktion zwischen Wirtszellfaktoren und den A-Domänen ADP-ribosylierender Toxine widmen, um z.B. herauszufinden, ob die Wirtszellfaktoren an der Rückfaltung der A-Domänen in ihre aktive Konformation beteiligt sind. Einen weiteren wichtigen Aspekt der Arbeit wird die Untersuchung pharmakologischer Inhibitoren der Chaperon/PPIase-Aktivität im humanen Minigut-Modell darstellen. Eine besondere Rolle spielen hier neuartige, verbesserte Inhibitorerivate wie z.B. das Cyclosporin-Derivat VK112, das im Gegensatz zur Ausgangssubstanz keinen immunsuppressiven Effekt zeigt, was einen entscheidenden Vorteil bei der Therapie einer Infektion mit Toxin-produzierenden Bakterien darstellt (Ernst et al., 2015). Ergebnisse dieser Forschungsarbeit sollen zu einem besseren Verständnis des Aufnahmemechanismus ADP-ribosylierender Toxine beitragen und zudem Ansätze zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen Krankheiten wie Diphtherie, Keuchhusten, Cholera und schwerwiegende enterotoxische Krankheiten liefern.

Barth, H., and Ernst, K. (2016). Chaperones and ADP-Ribosylating Bacterial Toxins. In *Microbial Toxins*, P. Gopalakrishnakone, B. Stiles, A. Alape-Girón, J.D. Dubreuil, and M. Mandal, eds. (Springer Netherlands), pp. 1–22.

Ernst, K., Schmid, J., Beck, M., Hägele, M., Hohwieler, M., Hauff, P., Ückert, A.-K., Fauler, M., Jank, T., Aktories, K., et al. (in Revision). Hsp70 is required for the trans-membrane transport of bacterial ADP-ribosylating toxins into the cytosol of mammalian cells. *Sci. Rep.*

Ernst, K., Langer, S., Kaiser, E., Osseforth, C., Michaelis, J., Popoff, M.R., Schwan, C., Aktories, K., Kahlert, V., Malesevic, M., et al. (2015). Cyclophilin-facilitated membrane translocation as pharmacological target to prevent intoxication of mammalian cells by binary clostridial actin ADP-ribosylated toxins. *J. Mol. Biol.* 427, 1224–1238.

Ernst, K., Liebscher, M., Mathea, S., Granzhan, A., Schmid, J., Popoff, M.R., Ihmels, H., Barth, H., and Schiene-Fischer, C. (2016). A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin. *Sci. Rep.* 6, 20301.

Gerding, D.N., Johnson, S., Rupnik, M., and Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5, 15–27.

Kaiser, E., Böhm, N., Ernst, K., Langer, S., Schwan, C., Aktories, K., Popoff, M., Fischer, G., and Barth, H. (2012). FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium botulinum* C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 14, 1193–1205.

Lang, A.E., Ernst, K., Lee, H., Papatheodorou, P., Schwan, C., Barth, H., and Aktories, K. (2014). The chaperone Hsp90 and PPIases of the cyclophilin and FKBP families facilitate membrane translocation of *Photobacterium luminescens* ADP-ribosyltransferases. *Cell. Microbiol.* 16, 490–503.

Schuster, M., Schnell, L., Feigl, P., Birkhofer, C., Mohr, K., Roeder, M., Carle, S., Langer, S., Toppel, F., Buchner, J., et al. (2017). The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. *Sci. Rep.*, im Druck.

