



## FACT SHEET

# Choleratoxin

## 1. Allgemeines

Das Choleratoxin (Abb. 2) ist ein von dem Bakterium *Vibrio cholerae* (Abb. 1) abgesondertes Enterotoxin und ist verantwortlich für die als Cholera bekannte schwere Durchfallerkrankung. Es gehört zu der Familie der AB-Toxine, wobei die grössere rezeptorbindende B-Untereinheit an die Zellen der Darmschleimhaut bindet und die Aufnahme des Toxins in die Zelle ermöglicht. Die enzymatisch aktive A1-Domäne der A-Untereinheit ist verantwortlich für die permanente Aktivierung der Adenylylcyclase und somit für die Überproduktion von cAMP. Dies führt insbesondere zur Sekretion von Chlorid und damit verbunden zu einem osmotischen Wasserausfluss aus der Zelle in das Darmgewebe hinein, resultierend in einer schweren Diarrhö [1], [2].

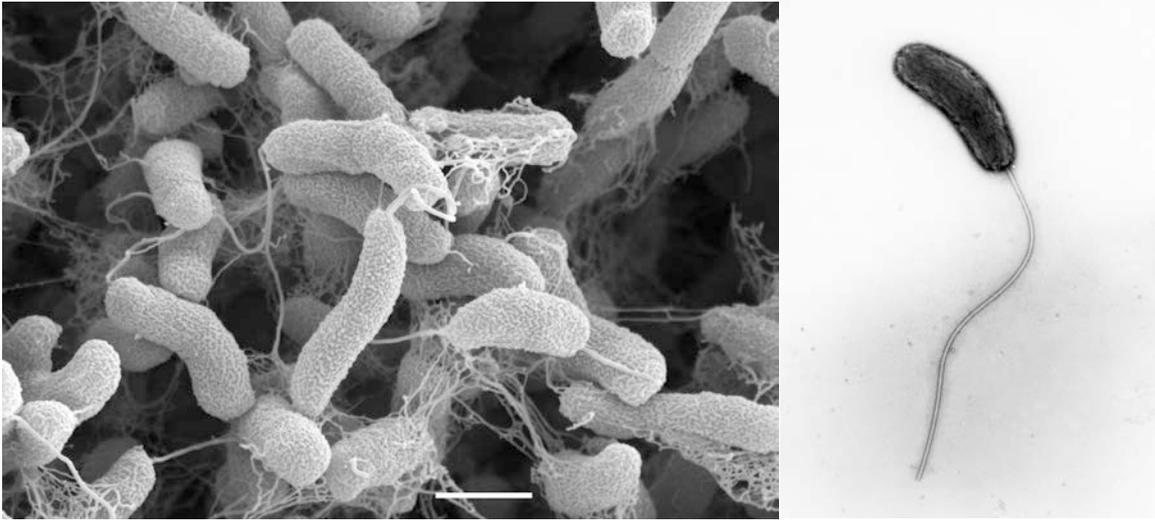
*Vibrio cholerae* ist ein natürliches Mitglied der aquatischen mikrobiologischen Gemeinschaft und kommt in warmem Wasser, insbesondere in den Tropen und Subtropen, bei moderater Salinität vor [3]. Die Infektion der Menschen wurde bislang via Umwelt, Trink- und Kochwasser, sowie durch Bewässerungswasser und den Verzehr von Quallen demonstriert [3].

Cholera, dessen erste Pandemie 200 Jahre zurückliegt, ist heute grösstenteils aus den entwickelten Ländern verschwunden. In Entwicklungs- und Schwellenländern mit unzureichender Hygiene, verbunden mit fehlenden oder mangelnden sanitären Anlagen und Wasserreinigungssystemen, bleibt sie jedoch noch heute bestehen [3], [4]. Seit 1961 ist bereits die siebte Pandemie im Gange, welche ausgehend von Indonesien sich in drei Wellen ausbreitete und jährlich zu 3-5 Millionen gemeldeten Erkrankungen führt [4], [5].

Bis heute sind ca. 200 Serogruppen von *V. cholerae* bekannt, von denen nur die Serogruppen O1 (bestehend aus dem „klassischen“ und „El Tor“ Biotypen) und O139 für die Cholera-Pandemien verantwortlich sind [3], [5].

## 2. Chemische Struktur und Eigenschaften

Das Choleratoxin gehört zu der Familie der AB Toxine und ist ein Protein bestehend aus einer heterodimeren A-Untereinheit (240 Aminosäuren, ca. 27.4 kDa) und einer homopentamerischen B-Untereinheit (ca. 58 kDa, Abb. 2). Die fünf identischen B-Monomere (je 103 Aminosäuren und ca. 11.6 kDa) sind ringförmig angeordnet, mit Wasserstoff- und Salzbrücken miteinander verbunden und besitzen jeweils eine Bindungsstelle für den Plasmamembranrezeptor GM1 [1], [2], [6]–[9]. Gelöst in Natriumdodecylsulfat ist das Choleratoxin aussergewöhnlich stabil und bleibt selbst bei Siedetemperatur aktiv [8].



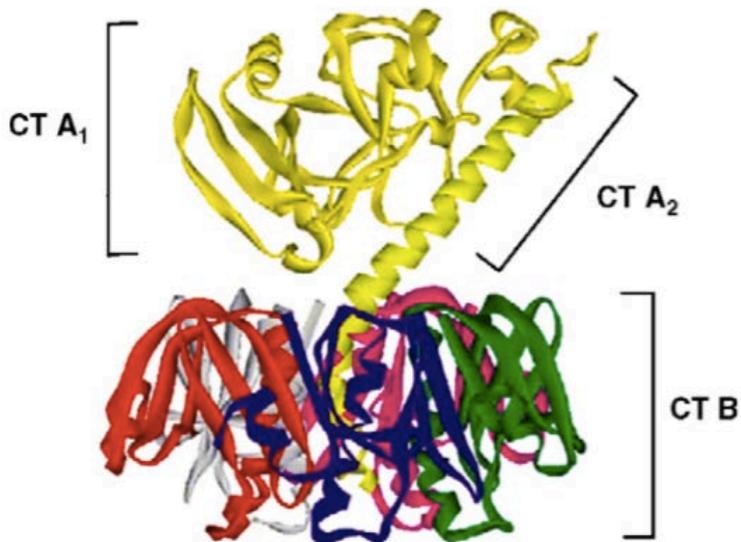
**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Vibrio cholerae* (Bilderverzeichnis: [1])

Die A-Untereinheit entspricht einer Polypeptidkette aus zwei Domänen, der A<sub>1</sub>-Domäne (ca. 22 kDa) und der A<sub>2</sub>-Domäne (ca. 5.4 kDa), verbunden mit einer Disulfidbrücke (Abb. 2). Während erstere für die katalytische Funktion des Toxins verantwortlich ist, verlinkt letztere die A- mit der B-Untereinheit durch eine nichtkovalente Bindung und spielt womöglich eine Rolle beim Transport des Toxins innerhalb der Zelle [1], [2], [6]–[9].

Die B-Untereinheit bindet mit hoher Affinität und Spezifität an das Gangliosid GM1 der Darmschleimhautzellen. Dadurch wird das Cholera toxin von der Zelle internalisiert und in endozytotischen Vesikeln retrograd durch den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert (Abb.3) [1], [2], [6], [9], [10]. Dort angekommen bindet das Protein Disulfid Isomerase (PDI) an die A1-Domäne und veranlasst dessen Abspaltung vom Rest des Toxins sowie dessen Auffaltung [9], [11]. Schliesslich gelangt die enzymatisch aktive A1-Domäne über den Sec61p-Kanal in das Cytosol der Zielzelle [1], [2], [6], [7], [9].

Als potente NAD-Glycohydrolase katalysiert das A1-Fragment die Produktion von ADP-Ribose und veranlasst aufgrund der zusätzlichen ADP-Ribosyltransferase-Funktion dessen Bindung an Gs-Proteine (Abb. 3). Gs-Proteine sind eine Subfamilie der GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) und regulieren die Aktivität der assoziierten Adenylylcyclasen. Die ADP-ribosylierung des Gs-Proteins verhindert die Hydrolyse des daran gebundenen GTPs und somit die Inaktivierung der Adenylylcyclase. Diese produziert daraufhin vermehrt den Botenstoff cAMP, welcher seinerseits zur Öffnung des Chloridkanals in der Zellmembran und somit zu einem massiven Chlorid- sowie osmotisch bedingten Natrium- und Wasserverlust führt. Die durch das Cholera toxin verursachte Signalkaskade führt somit zur Störung des Elektrolythaushaltes der Darmschleimhautzellen und äussert sich schliesslich durch eine starke Diarrhö, wobei enorme Wassermengen verloren gehen [1], [2], [6]–[9], [12].

Obwohl *V. cholerae* Teil der natürlichen Bakterienflora in Fluss- und Mündungsgebieten ist, kommen die für die Choleraerkrankung verantwortlichen Serogruppen O1 und O139 weniger in der Umwelt vor als andere Serogruppen. Abseits von Cholera-Gebieten fehlen den isolierten O1 und O139 Stämmen sogar meist die auf Plasmiden lokalisierten Cholera toxin-Gene. Es wird vermutet, dass sich die toxischen Bakterienstämme an den Magen-Darm-Trakt des Menschen adaptiert haben. Des Weiteren wird angenommen, dass die pathogenen Gene via horizontalem Gentransfer weitergegeben werden können, womit sich weitere natürliche Bakterienstämme von *V. cholerae* durch Aquisition der Virulenzgene an den menschlichen Körper anpassen könnten [4].



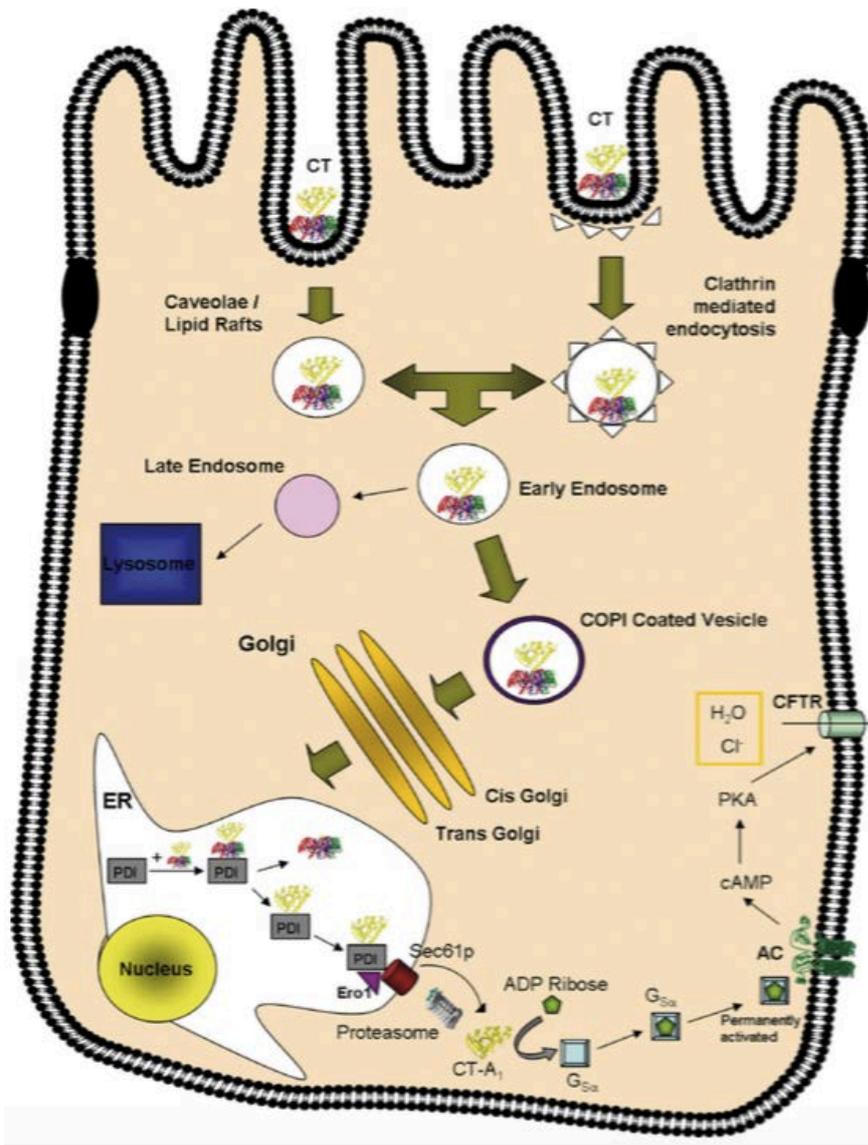
**Abb. 2:** Cholera toxin, bestehend aus einer A-Untereinheit und einer B-Untereinheit. Die A-Untereinheit besitzt zwei Domäne (A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>), die B-Untereinheit besteht aus fünf identischen ringförmig angeordneten B-Monomeren (Graphik übernommen aus [1]).

### 3. Toxizität

Cholerainfektionen kommen mehrheitlich mangels Hygiene zustande, indem *V. cholerae* durch mit Klärwasser kontaminiertes Wasser aufgenommen wird. Die Bakterien setzen sich an der Darmwand fest und sondern das Cholera toxin ab. Cholera-Patienten können pro Stunde einen Liter oder mehr Flüssigkeit verlieren, wobei der Körper schwerwiegend dehydriert wird [8]. In Extremfällen wurden kolossale Flüssigkeitsverluste von 30 – 40 Liter pro Tag dokumentiert [7]. Ohne ausreichende Behandlung hat eine Choleraerkrankung oftmals den Tod zur Folge. Die Behandlung ist jedoch sehr simpel und besteht lediglich aus der künstlichen Rehydrierung des Patienten, oral oder intravenös, oft kombiniert mit Elektrolyten und Antibiotika [1], [8].

Viele Forscher versuchten die für den Menschen spezifische Cholera Erkrankung auch in Versuchstieren hervorzurufen, scheiterten jedoch entweder bereits bei der Infektion oder konnten ihre Ergebnisse nicht replizieren [13]. Aus diesem Grund liegen mit der uns zur Verfügung stehenden Literatur keine LD<sub>50</sub>-Werte des Cholera toxins vor.

Forcierte Infektionen in 10 Jahre alten Ratten sahen denen an Menschen beobachteten Symptome am ähnlichsten. Dabei wurden die Tiere mit 10<sup>7</sup>000 *Vibrio cholerae* infiziert, indem diese gezielt in den Darm der Ratten injiziert wurden. Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 22 Stunden setzte anfänglich eine leichte Diarrhö ein, die immer heftiger wurde. Die Versuchstiere starben nach durchschnittlich 32 Stunden. Der Krankheitsverlauf war gekennzeichnet durch starken Durchfall, Dehydrierung und gelegentliche Muskelkrämpfe [13].



**Abb. 3:** Prozesse in den Zellen der Darmschleimhaut, ausgelöst durch das Cholera-toxin: Das Toxin gelangt durch verschiedene endozytotische Wege in die Zelle hinein und wandert als Vesikel durch den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum. Dort angekommen bindet das Protein Disulfid Isomerase (PDI) an die A1-Domäne und veranlasst dessen Abspaltung vom Rest des Toxins sowie dessen Auffaltung. . Über den Sec61p-Kanal gelangt das Fragment in das Cytosol und katalysiert die Produktion und Bindung von ADP-Ribose an das Gs-Protein. Dies führt zur permanenten Aktivierung der Adenylcyclase (AC) und somit zur vermehrten Produktion des Botenstoffs cAMP, welcher seinerseits zur Öffnung des Chloridkanals (CFTR) und damit verbunden zu einem massiven Chlorid- sowie osmotisch bedingten Natrium- und Wasserverlust führt (Graphik aus [1]).

## 4. Anwendungen

Das Cholera-toxin löst eine starke immunologische Aktivität aus, wodurch das Toxin als potentielltes Hilfsmittel zur Immunisierung weiterer oral aufgenommener Antigene diskutiert wird. Verstärkte Immunantworten werden dabei bereits mit geringen Dosen an Cholera-toxin erreicht, die unterhalb von toxischen Nebeneffekten liegen. Da die rezeptorbindende B-Untereinheit als das eigentliche immunogene Hilfsmittel identifiziert wurde, können durch dessen intranasalen oder intravenösen Verabreichung toxische Effekte ganz ausgeschlos-

sen werden. Die orale Aufnahme hingegen benötigt das gesamte Protein, womöglich um unbeschädigt den Magen passieren zu können [1], [9], [14].

Gleichzeitig wurde demonstriert, dass die B-Untereinheit umgekehrt auch als Immunomodulator dienen und Immuntoleranz hervorrufen kann [9], [15]. Die damit verbundene Hemmung der Immunreaktion birgt in der Medizin grosses Potential in der Milderung von Autoimmunerkrankheiten sowie der Organabstossung nach Transplantationen [14], [15].

Die Widersprüchlichkeit dieser beiden Funktionen des Cholera-Toxins zeigt auf, in welche komplexe Immunsystem-Interaktionen das Toxin involviert ist. Es wird vermutet, dass die Art der Immunreaktion von der Natur der Krankheit abhängt, für die das Cholera-Toxin eingesetzt wird [14].

Da Cholera gegenwärtig insbesondere in Afrika und Asien noch immer präsent ist, wurden mehrere Impfstoffe entwickelt und getestet. Der international lizenzierte orale Impfstoff Dukoral<sup>®</sup> besteht aus inaktivierten *V. cholerae* Bakterien, kombiniert mit rekombinanten B-Untereinheiten des Cholera-Toxins (rCTB-WC) [16], [17]. Bei umfassenden Feldversuchen in Bangladesch mit 62'285 Probanden stellte sich nach drei Jahren mit dreifacher Impfung noch eine kumulative Schutzwirkung von 50 % ein. Im ersten Jahr betrug die Schutzwirkung 62 % [18]. Durch die Einführung der rekombinanten DNA-Technologie zur Herstellung der Cholera-Toxin B-Untereinheit wurde die umfangreiche und kostengünstige Produktion des Cholera Impfstoffs Dukoral<sup>®</sup> ermöglicht [19].

## 5. Analytik

### 5.1 Immunosensoren

Sowohl der „flow-injection capacitive immunosensor“ als auch der „flow-injection impedimetric immunosensor“ stellen kostengünstige und hoch sensible Nachweismethoden für das Cholera-Toxin dar. Erstere weist eine Nachweisgrenze von  $1.0 \times 10^{-14}$  M auf, während der zweite Immunosensor als Biochip aufgebaut ist und minimale Toxinkonzentrationen von  $0.5 \times 10^{-11}$  M nachweisen kann [20], [21].

### 5.2 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Sandwich-ELISA stellt ebenfalls eine verlässliche Nachweismethode für Cholera-Toxin dar, dessen Nachweisgrenze bei  $1.2 \times 10^{-12}$  M liegt [21].

### 5.3 Chromatografie

Van Baar et al. (1999) konnten mittels „Flow-Injection Electrospray Mass Spectrometry“ (FIA-ESI-MS) eine Möglichkeit für den direkten Nachweis der A- und B-Untereinheiten aufzeigen. Eine erweiterte Identifikation gelang anhand tryptischem Verdau des Cholera-Toxins und anschliessendem Nachweis der Fragmente mittels „Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry“ (LC-ESI-MS). In einer weiteren Stufe konnte er für die eindeutige Identifikation mittels LC-ESI-MS/MS an ausgewählten tryptischen Fragmenten Sequenzinformationen erhalten [22].

## Literaturverzeichnis:

- [1] D. Vanden Broeck, C. Horvath, und M. J. S. De Wolf, „Vibrio cholerae: Cholera toxin“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Bd. 39, Nr. 10, S. 1771–1775, 2007.
- [2] L. de Haan und T. R. Hirst, „Cholera toxin: A paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review)“, *Molecular Membrane Biology*, Bd. 21, Nr. 2, S. 77–92, März 2004.
- [3] E. K. Lipp, A. Huq, und R. R. Colwell, „Effects of Global Climate on Infectious Disease: the Cholera Model“, *Clin. Microbiol. Rev.*, Bd. 15, Nr. 4, S. 757–770, Jan. 2002.
- [4] S. M. Faruque, M. J. Albert, und J. J. Mekalanos, „Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic Vibrio cholerae“, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Bd. 62, Nr. 4, S. 1301–1314, Jan. 1998.
- [5] A. Mutreja, D. W. Kim, N. R. Thomson, T. R. Connor, J. H. Lee, S. Kariuki, N. J. Croucher, S. Y. Choi, S. R. Harris, M. Lebens, S. K. Niyogi, E. J. Kim, T. Ramamurthy, J. Chun, J. L. N. Wood, J. D. Clemens, C. Czerkinsky, G. B. Nair, J. Holmgren, J. Parkhill, und G. Dougan, „Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic“, *Nature*, Bd. 477, Nr. 7365, S. 462–465, Sep. 2011.
- [6] W. I. Lencer, T. R. Hirst, und R. K. Holmes, „Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1450, Nr. 3, S. 177–190, Juli 1999.
- [7] J. Sánchez und J. Holmgren, „Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 65, Nr. 9, S. 1347–1360, Feb. 2008.
- [8] S. Van Heyningen, „Cholera toxin“, *Bioscience reports*, Bd. 2, Nr. 3, S. 135–146, 1982.
- [9] D. Ladant, J. E. Alouf, und M. R. Popoff, *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, 2005.
- [10] W. I. Lencer, C. Delp, M. R. Neutra, und J. L. Madara, „Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic“, *J Cell Biol*, Bd. 117, Nr. 6, S. 1197–1209, Juni 1992.
- [11] B. Tsai, C. Rodighiero, W. I. Lencer, und T. A. Rapoport, „Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin“, *Cell*, Bd. 104, Nr. 6, S. 937–948, 2001.
- [12] D. Cassel und Z. Selinger, „Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site“, *PNAS*, Bd. 74, Nr. 8, S. 3307–3311, Jan. 1977.
- [13] N. K. Dutta und M. K. Habbu, „Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation“, *British journal of pharmacology and chemotherapy*, Bd. 10, Nr. 2, S. 153–159, 1955.
- [14] N. A. Williams, T. R. Hirst, und T. O. Nashar, „Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic“, *Immunology Today*, Bd. 20, Nr. 2, S. 95–101, Feb. 1999.
- [15] J. B. Sun, J. Holmgren, und C. Czerkinsky, „Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance“, *PNAS*, Bd. 91, Nr. 23, S. 10795–10799, Aug. 1994.
- [16] D. R. Hill, L. Ford, und D. G. Lalloo, „Oral cholera vaccines: use in clinical practice“, *The Lancet infectious diseases*, Bd. 6, Nr. 6, S. 361–373, 2006.
- [17] A. M. Khatib, M. Ali, L. von Seidlein, D. R. Kim, R. Hashim, R. Reyburn, B. Ley, K. Thriemer, G. Enwere, R. Hutubessy, und others, „Effectiveness of an oral cholera vaccine in Zanzibar: findings from a mass vaccination campaign and observational cohort study“, *The Lancet infectious diseases*, Bd. 12, Nr. 11, S. 837–844, 2012.
- [18] J. D. Clemens, D. A. Sack, J. R. Harris, F. van Loon, J. Chakraborty, F. Ahmed, M. R. Rao, M. R. Khan, M. Yunus, N. Huda, B. F. Stanton, B. A. Kay, R. Eeckels, J. D. Clemens, M. R. Rao, B. A. Kay, D. A. Sack, J. R. Harris, B. F. Stanton, S. Walter, R. Eeckels, A.-M. Svennerholm, und J. Holmgren, „Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from three-year follow-up“, *The Lancet*, Bd. 335, Nr. 8684, S. 270–273, Feb. 1990.
- [19] J. Holmgren, A. M. Svennerholm, M. Jertborn, J. Clemens, D. A. Sack, R. Salenstedt, und H. Wigzell, „An oral B subunit: whole cell vaccine against cholera“, *Vaccine*, Bd. 10, Nr. 13, S. 911–914, 1992.

- [20] M. S. Chiriaco, E. Primiceri, E. D'Amone, R. E. Ionescu, R. Rinaldi, und G. Maruccio, „EIS microfluidic chips for flow immunoassay and ultrasensitive cholera toxin detection“, *Lab Chip*, Bd. 11, Nr. 4, S. 658–663, 2011.
- [21] M. Labib, M. Hedström, M. Amin, und B. Mattiasson, „A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin“, *Analytica Chimica Acta*, Bd. 634, Nr. 2, S. 255–261, Feb. 2009.
- [22] B. L. M. van Baar, A. G. Hulst, und E. R. J. Wils, „Characterisation of cholera toxin by liquid chromatography—Electrospray mass spectrometry“, *Toxicon*, Bd. 37, Nr. 1, S. 85–108, Jan. 1999.

## Bilderverzeichnis:

- [1] Robert Koch Institut. EM-Aufnahmen – *Vibrio cholerae*.  
[https://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Vibrio\\_cholerae/EM\\_Tab\\_Vibrio\\_cholerae.html](https://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Vibrio_cholerae/EM_Tab_Vibrio_cholerae.html) (heruntergeladen am 26.09.2016)

LABOR SPIEZ – 03.10.2016 – Gessica Gambaro