

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie,  
Infektiologie und Rheumatologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Störung der intestinalen epithelialen Barrierefunktion durch  
Microcystin in Caco-2-Zellen

Intestinal epithelial barrier dysfunction by microcystin in Caco-2  
cells

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan-Leo Kaak

aus

Potsdam

Datum der Promotion: 29.11.2024



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
Zusammenfassung .....	1
1. Einleitung .....	4
1.1 Cyanobakterien .....	4
1.1.1 <i>Cyanobacteria</i> und Algenblüte .....	4
1.1.2 Cyanotoxine .....	5
1.2 Gastrointestinale Transport- und Barrierefunktion und Diarrhömechanismen .....	6
1.3 Fragestellung .....	8
2. Methodik .....	9
2.1 Zellkultur .....	9
2.2 Toxinzugabe .....	9
2.3 Barrierefunktion des Epithels .....	9
2.4 Tight Junction-Proteinexpression im Western Blot .....	10
2.5 Immunfärbung und <i>stimulated emission depletion</i> (STED)-Mikroskopie der Tight Junction-Proteine .....	10
2.6 Epithelialer Zelltod .....	11
2.7 Inhibitorversuche .....	11
2.8 Statistische Analyse .....	11
3. Ergebnisse .....	12
3.1 Epitheliale Barrierestörung durch Microcystin .....	12
3.2 Reduktion des barrierebildenden Proteins Claudin-1 und Spaltung von Tight Junctions .....	13
3.3 Induktion epithelialer Apoptose durch Microcystin .....	16
3.4 Zytoskelettale Veränderungen führen zur Tight Junction-Störung .....	17
4. Diskussion .....	19

---

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	19
4.2 Gesundheitliche Auswirkungen von Cyanotoxinen .....	19
4.3 Intestinale Pathologien durch Cyanotoxine .....	20
4.4 Epitheliale Barrieredysfunktion .....	20
4.5 Proteinphosphatase-Inhibition und Änderungen im Zytoskelett .....	21
4.6 Stärken und Schwächen der Studie .....	24
4.7 Implikationen für zukünftige Forschung .....	25
5. Schlussfolgerungen .....	26
Literaturverzeichnis .....	28
Eidesstattliche Versicherung .....	32
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....	33
Druckexemplar der Publikation .....	34
Lebenslauf .....	43
Komplette Publikationsliste .....	44
Danksagung .....	45

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des Microcystins.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Zellmonolayers.....	6
Abbildung 3: Widerstand und Permeabilität von Caco-2 Zellmonolayern.....	11
Abbildung 4: Proteinexpressionslevel in Caco-2 Zellmonolayern.....	12
Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2 Zellmonolayern.....	14
Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch Microcystin-LR.....	16
Abbildung 7: Mikrostruktur und Barrierefunktion von Caco-2 Zellmonolayern.....	17

## Abkürzungsverzeichnis

Å – Ångström (Längeneinheit, 1 Å entspricht  $10^{-10}$  m)

Akt – Proteinkinase B

Caco-2 – *Cancer coli 2*-Zelllinie, Humane kolorektale Adenokarzinoma-Zellen

CDC – *Cell division cycle*; Phosphatase, die bei der Regulation des Zellzyklus wichtig ist

CLSM – Confocale Laser-Scanning-Mikroskopie

GTP – Guanosintriphosphat

LD50 – Letale Dosis (Mengenangabe bei der 50% einer Population bestimmter Lebewesen sterben)

MC-LR – Microcystin-LR

MEK – MAPK/ERK Kinase

MEM – *Minimum essential media*

MLC – Myosin Leichtkette

MLCK – Myosin Leichtkettenkinase

OATP – Organo-Anion-Transporter

PFT – Porenformendes Toxin

PP – Proteinphosphatase

Raf – Rapidly accelerated fibrosarcoma

RhoA – Ras homolog family member A

ROCK – Rho-assoziierte Proteinkinase

SGLT – Natriumabhängige Glukose-Cotransporter

STED – Stimulated emission depletion

TER – Transepithelialer elektrischer Widerstand

TJ – Tight Junction, dt. Schlussleiste

ZO-1 – Zonula occludens Protein-1

## Zusammenfassung

Cyanobakterien, auch bekannt als Blaualgen, sind photosynthetische gramnegative Bakterien. Sie gehören zu den ältesten Lebensformen der Welt und sind in verschiedenen aquatischen Umgebungen zu finden. Cyanobakterienblüten sind aufgrund von Faktoren wie dem globalen Temperaturanstieg und der erhöhten Verfügbarkeit von Stickstoff aus Quellen wie Düngemitteln immer häufiger anzutreffen. Diese Algenblüten können ein Gesundheitsrisiko für Menschen, Tiere und Wasserlebewesen darstellen. Microcystin, ein weit verbreitetes Toxin, das von Cyanobakterien produziert wird, löst bei oraler Aufnahme aufgrund seiner Auswirkungen auf die Darmfunktion Durchfallerscheinungen aus. Unterschiedliche Diarrhöemechnismen, wie sekretorische oder malabsorptive Durchfalltypen oder die Durchfallentstehung durch eine Undichtigkeit des Epithels wurden für die Vergiftung mit Microcystin diskutiert, aber bisher nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Studie war es in einem experimentellen Modell menschlicher Dünndarmepithelzellen (Caco-2) den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären, durch den Microcystin zu Durchfall führt. Wir führten funktionelle und molekulare Analysen an mit Microcystin behandelten Caco-2-Epithelmonolayern durch, um die Barrierefunktion zu untersuchen. Unsere Analysen konzentrierten sich auf die Untersuchung von Veränderungen der Tight Junctions (TJs) und Zellschäden, die mit funktionellen Veränderungen im transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) korrelieren. Nach einer 24-stündigen Microcystin-Exposition verringerte sich der TER in Caco-2-Zellen im Vergleich zum Ausgangswert um 65 %, während gleichzeitig die Permeabilität für Fluorescein auf das 2,6-fache anstieg. In der Western-Blot-Analyse wurde eine Verringerung der Claudin-1-Expression, jedoch keine Veränderungen der Claudin-3 und -4-Expression festgestellt. Mit Hilfe der hochauflösenden STED-Mikroskopie konnten wir feststellen, dass die Integrität der TJs beeinträchtigt war, gekennzeichnet durch das Ausfransen und Aufspalten der TJ-Domäne in den Epithelzellen, während die epitheliale Apoptose nicht wesentlich zur Störung der epithelialen Barriere beitrug. Stattdessen war die Einschnürung des Zytoskeletts mit dem Zerfall der TJ und der Entwicklung des Barrieredefekts verbunden. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Behandlung der Caco-2-Zellen mit spezifischen MLCK-Inhibitoren die Auswirkungen des Toxins auf die Barrierefunktion aufhob. Folglich deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass MLCK-abhängige Veränderungen der TJ der primäre Pathomechanismus sind, der für den "Leak-Flux"-Typ der Diarrhöe verantwortlich ist. Ein neuarti-

ger Ansatz für das Screening von Signalwegen könnte die RNA-Sequenzierung mit bioinformatischer Analyse der mit Microcystin behandelten Zellen umfassen. Weitere Grundlagenforschung zur Regulierung des Zytoskeletts und der TJ durch Proteinphosphatase-Regulationsmechanismen könnte relevante Ergebnisse und Gegenmaßnahmen zur Vergiftung mit Microcystin liefern.

## **Abstract**

Cyanobacteria, also known as blue-green algae, are photosynthetic Gram-negative bacteria. They are among the oldest life forms on Earth and are commonly found in various aquatic environments. Cyanobacterial blooms have become increasingly common due to factors such as rising global temperatures and increased nitrogen availability from sources like fertilizers. These algae blooms can pose health risks to humans, animals, and aquatic life. Microcystin, a common toxin produced by cyanobacteria, causes diarrhea when ingested orally due to its effects on intestinal function. Different diarrhea mechanisms, such as secretory or malabsorptive types of diarrhea or diarrhea caused by leakage of the epithelium, have been discussed for microcystin poisoning but have not been adequately investigated. The aim of this study was to elucidate the underlying mechanism by which microcystin leads to diarrhea in an experimental model of human small intestinal epithelial cells (Caco-2). We conducted functional and molecular analyses on microcystin-treated Caco-2 epithelial monolayers to investigate barrier dysfunction. Our assessment focused on investigating alterations in tight junctions (TJs) and cell damage that correlate with functional changes in transepithelial electrical resistance (TER). Following 24 hours of exposure to microcystin, TER in Caco-2 cells decreased by 65% compared to its initial value, while simultaneously, the permeability to fluorescein increased 2.6-fold. A reduction in claudin-1 expression, with no changes in claudin-3 and -4 expression was observed in Western blot analysis. Employing super-resolution STED microscopy, we could find that the integrity of TJs was compromised, characterized by the fraying and splitting of the TJ domain in the epithelial cells while epithelial apoptosis did not substantially contribute to the disruption of the epithelial barrier. Instead, cytoskeletal actomyosin constriction was associated with TJ disintegration and the development of the barrier de-



fect. In addition, we demonstrated that treatment of Caco-2 cells with specific MLCK inhibitors abolished effects of the toxin on barrier function. Consequently, our results suggest MLCK-dependent changes of the TJ as the primary pathomechanism responsible for the "leak flux" type of diarrhea. A novel approach for screening signaling pathways could involve RNA-sequencing of microcystin-treated cells, followed by bioinformatics pathway analysis. Further foundational research into cytoskeletal and TJ regulation through protein phosphatase regulatory mechanisms could provide relevant results and countermeasures for microcystin poisoning.

## Einleitung

### 1.1 Cyanobakterien

#### 1.1.1 *Cyanobacteria* und Algenblüte

Cyanobakterien (syn. Blaualgen) sind Photosynthese-betreibende Gram-negative Bakterien.(1) Sie bilden eine der ältesten Lebensformen der Erde und sind in zahlreichen Gewässern, am häufigsten in Seen und anderen Süßwasserquellen, zu finden.(2) Sie verfügen über intrazelluläre Membransysteme, den Thylakoiden, die sie zur Photosynthese befähigen.(3) Manche Cyanobakterien sind zusätzlich in der Lage Stickstoff zu fixieren.(4) Cyanobakterien waren die ersten Sauerstoff-produzierenden Organismen. Es wird davon ausgegangen, dass sie durch ihre photosynthetische Aktivität im Erdalter, dem Archaikum vor über 2,5 Milliarden Jahren, die sauerstoffarme Erdatmosphäre in eine sauerstoffreiche Atmosphäre verändert haben. Sie waren dabei auch für ein Massensterben obligat anaerober Organismen verantwortlich im *Great Oxygen Event* (im dt. die Große Sauerstoffkatastrophe) vor etwa 2,4 Milliarden Jahren.(5) Erst dieser Wechsel der atmosphärischen Gaszusammensetzung hat das Entstehen heutiger Lebensformen ermöglicht.(6) Neben der Beschreibung zum essentiellen ökologischen Nutzen der Cyanobakterien im Stoffkreislauf, wurden auch Toxin-produzierenden Cyanobakterien identifiziert, die mit Erkrankungen assoziiert sind. Zu den für Menschen und Tiere gesundheitlich relevanten Cyanobakterien zählen unter anderem die Gattungen *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Lyngbya* und *Anabaenopsis*.(7)

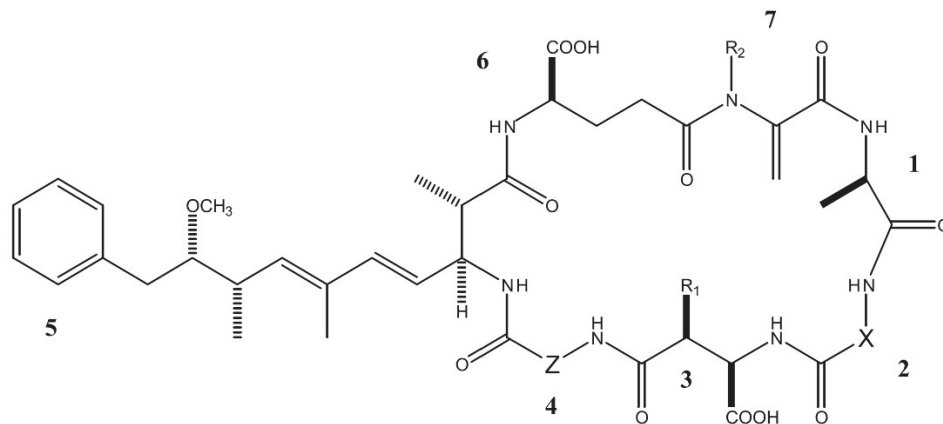
Cyanobakterien proliferieren häufig durch Anstieg der Wassertemperatur und Überdüngung, was zu einer Massenentwicklung der Organismen im Gewässer führt und als Blaualgenblüten bezeichnet wird. Dabei schwimmen die Bakterien an die Wasseroberfläche und formen teilweise dicke grüne Algenteppiche, welche hunderte Quadratkilometer groß werden können. Einhergehend mit der großen Menge an Bakterien ist das große Vorkommen an Cyanotoxinen. Diese Blüten stellen eine gesundheitliche Gefahr für Menschen und Tiere wie Vögel, Säugetiere und auch für Wasserlebewesen dar.(8) Blaualgenblüten sind in den letzten Jahren gehäuft aufgetreten, was auf mehrere Faktoren zurückzuführen ist. Die steigende globale Temperatur begünstigt das Wachstum der Bakterien. Erhöhte Stickstoffvorkommen unter anderem agrarwirtschaftlichen Dünger liefern große Mengen an Substrat.(9) Die Kombination aus Temperatur und Eutrophierung sorgt für häufigere

und größere Blüten als in den vorangegangenen Jahren. Diese Faktoren werden in den kommenden Jahren wahrscheinlich weiter zunehmen.

### 1.1.2 Cyanotoxine

Cyanobakterien produzieren eine Vielzahl an Toxinen, darunter Neurotoxine, Hepatotoxine, Cytotoxine und Endotoxine.(7) Der Kontakt mit Cyanobakterien kann sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern äußern. Dies tritt zum Beispiel auf, wenn mit Cyanotoxinen belastetes Wasser während einer Blaualgenblüte verschluckt wird. Beim Menschen zeigen sich am häufigsten Hautausschläge und gastrointestinale Symptome wie Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall.(10) Bereits 1878 wurde festgestellt, dass mit Cyanobakterien verunreinigtes Wasser für Tiere, insbesondere Haustiere (Kühe, Hunde) tödlich sein kann.(11) 2010 wurde zum ersten Mal festgestellt, dass auch Meeressäuger durch die Aufnahme von Cyanotoxinen gestorben sind.(12) 1996 entwickelten 100 Patientinnen und Patienten in Caruaru (Brasilien) akutes Leberversagen, nachdem sie mit Cyanobakterien belastetes Dialysat zur Nierenersatztherapie erhielten. Von den erkrankten Personen verstarben 76, wovon 52 Fälle auf das danach benannte Caruaru-Syndrom zurückzuführen waren.(13)

Die chemische Struktur der Cyanotoxine unterteilt sich in drei Gruppen: zyklische Peptide, Alkaloide und Lipopolysaccharide. Die zyklischen Peptide sind hierbei für die Entstehung von Symptomen von größerer Bedeutung. Bei Aufnahme können diese in der Leber akkumulieren und hepatotoxisch wirken.(7) Die Aufnahme kleinerer Mengen über einen längeren Zeitraum kann die Entstehung von Leber- und anderen Tumoren begünstigen.(7, 14) Eines der Toxine ist das zyklische Peptid Microcystin. Es sind etwa 60 verschiedene Varianten bekannt, von welchen Microcystin-LR am häufigsten beschrieben ist (Abbildung 1).(7)



X→L-Leucin, Z→L-Arginin bei Microcystin-LR

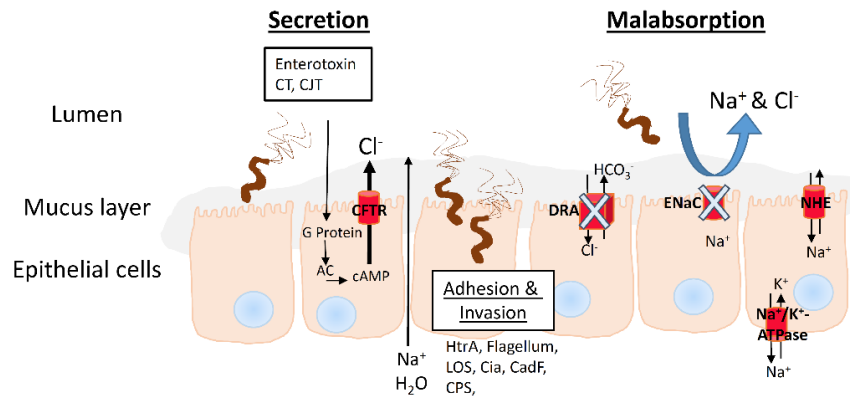
**Abbildung 1:** Strukturformel des Microcystin mit sieben variablen Bindestellen für unterschiedliche Aminosäuren, die eine Unterscheidung in mehr als 60 Microcystin-Typen zulässt. Microcystin-LR zeichnet sich durch Bindung von Leucin und Arginin an Position 2 und 4 aus. (*modifiziert nach McElhiney et al., 2005 (15)*)

## 1.2 Gastrointestinale Transport- und Barrierefunktion und Diarrhömechanismen

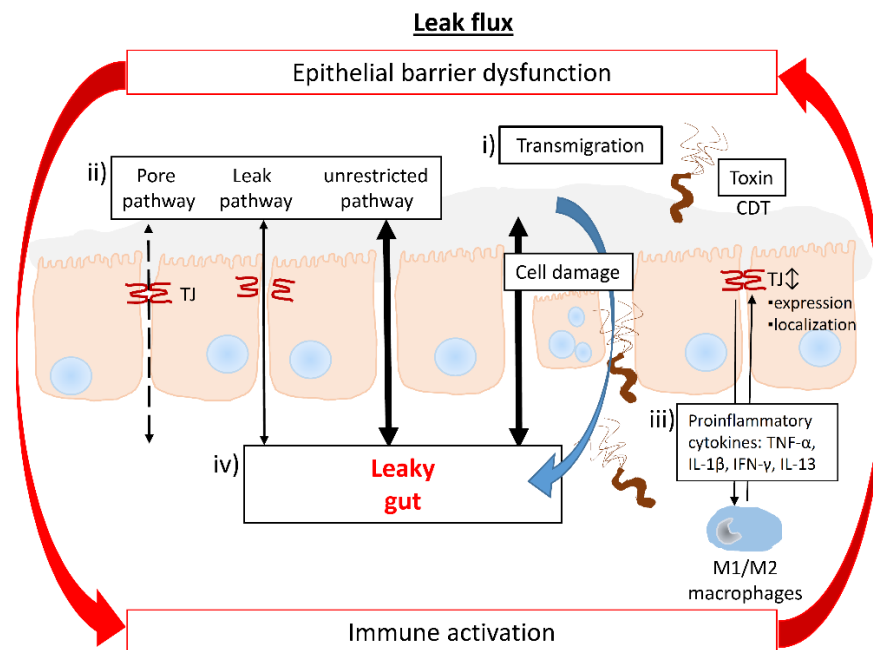
Die gastrointestinale Barriere beschreibt die Eigenschaft des Darms ungewünschte Substanzen aus dem Körper fernzuhalten und kontrolliert hilfreiche und notwendige Stoffe in den Körper aufzunehmen. So schützt sie den Körper vor der Aufnahme von Noxen wie zum Beispiel Mikroorganismen, Toxinen und Antigenen. Die gastrointestinale Barriere wird durch Darmepithelzellen gebildet, welche mit Hilfe von Zell-Zell-Kontakten eine physikalische Trennung zwischen dem Darmlumen und dem Organismus darstellen. Um den Stofftransport zu ermöglichen, verfügen die Enterozyten über verschiedene Transport- und Sekretionsmechanismen und im jeweiligen Segment die physiologische Barrierefunktion. (16-18) Die Regulation oder Fehlregulation der intestinalen Permeabilität für Ionen und Makromoleküle kann durch unterschiedliche Faktoren wie Stimulanzien, Cytokine, Immunzellen oder exogene Faktoren beeinflusst werden. (19) Durch eine Störung der Transport- und Sekretionsmechanismen kann es zu einem erhöhten Wasserverlust ins Darmlumen kommen, was sich klinisch als Diarrhö zeigt. Im Rahmen einer Intoxikation mit Cyanotoxinen kommen drei mögliche Diarrhömechanismen in Frage: Sekretion, Malabsorption oder parazellulärer Leck-Flux. Durch erhöhte Chloridionensekretion kann es zu einem Verlust von Wasser kommen i.S. der Verschiebung des osmotischen Gefälles in Richtung Lumen (Sekretorische Diarrhö). Ist die Absorption von Natrium-, oder

Chloridionen oder auch Glucose gestört, verbleibt mehr Wasser im Lumen (Malabsorptive Diarrhö). Sind die Zell-Zell-Kontakte, insbesondere der Tight Junction (TJ), betroffen, kann es zu einem parazellulären Verlust an Ionen und somit auch Wasser kommen (Leck-Flux Diarrhö). Diese Diarrhömechanismen sind in Abbildung 2 beispielhaft skizziert. (20)

**A**



**B**



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines epithelialen Zellmonolayers. Mögliche Diarrhömechanismen können zu toxinbedingter oder Bakterien-induzierter (A) Sekretion und Malabsorption, oder (B) einer Störung der Zell-Zell-Kontakte mit erhöhtem parazellulärem Flux führen. Hier beispielhaft die Darstellung der pathogenetischen Prinzipien, die zur Diarrhö führen können, anhand der *Campylobacter*-Infektion. Hierbei spielt auch die Immuninduktion durch parazellulär eindringende Antigene, das sogenannte *Leaky Gut*-Phänomen eine Rolle. (20)

### 1.3 Fragestellung

Der Diarrhömechanismus durch das Cyanotoxin Microcystin und seine Auswirkungen auf den epithelialen Transport beziehungsweise die intestinale Barrierefunktion sind bisher ungeklärt. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass die Charakterisierung einer möglichen Barrierebeeinträchtigung durch Microcystin als Ursache für das Auftreten einer Diarrhö nach Cyanotoxinintoxikation als mechanistischer Erklärungsansatz dienen könnte. Als Hauptbestandteil der intestinalen Barriere sollten Dünndarm-relevante, barrierebildende Claudine in der TJ untersucht werden. Veränderungen der TJ-Zusammensetzung oder Zelltodmechanismen der Epithelzellen wurden hierbei als mögliche Ursache der Diarrhö in Betracht gezogen.

Eines der betroffenen Organe nach Cyanotoxin-Ingestion ist der obere Verdauungstrakt, da hier bereits Microcystin über die apikalen Membranen aufgenommen wird. Diese Aufnahme erfolgt einerseits rezeptorunabhängig und andererseits über OATP-rezeptorabhängige Mechanismen erst in den Dünndarmepithelzellen und nachfolgend, akkumulierend in der Leber.(21) Microcystine sind zyklische Heptapeptide, die durch die Hemmung der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A toxische Wirkung entfalten.(22) Andere Toxine wie Okadasäure aus Dinoflagellaten teilen nicht die gleiche Struktur, hemmen aber ebenfalls die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A.(23) Nach der Aufnahme in die Zellen, kommt es intrazellulär zu erhöhter Phosphorylierung mit zytopathischen Auswirkungen und Änderungen des Zytoskeletts, was schlussendlich zytotoxisch wirken kann.(24) Es ist denkbar, dass eine höhere Rate an Phosphorylierung direkt auf die TJ-Proteine in der Membran wirkt. Andererseits könnte die Phosphatasehemmung das *Signaling* durch Kinasen wie zum Beispiel der Myosin Light-Chain Kinase (MLCK) eine zytoskelettale Actomyosinkonstriktion verursachen und so den Zustand der TJs und der epithelialen Barriere indirekt beeinflussen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden mögliche Diarrhömechanismen wie der parazellulären Leck-Flux-Mechanismus analysiert. Insbesondere wurde der Leck-Flux hinsichtlich einer möglichen intestinalen Barriestörung, verursacht durch die Veränderungen an barrierebildenden Claudine, anhand eines humanen Dünndarm-ähnlichen Caco-2 Zellmodells untersucht.

## Methodik

### 2.1 Zellkultur

Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde in *minimum essential media* (MEM) mit Glutamax-1 Supplementation mit 15% fetalem Kalbserum und 1% Penicillin-Streptomycin (alle: Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Corning, Cornin, NY, USA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurde drei Mal wöchentlich für 14-21 Tage gefüttert und anschließend auf Millicell PCF Filter (0,4 µm Porengröße; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) ausgesät. Die Versuche wurden 21 Tage nach Aussaat durchgeführt, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt konfluent waren und dünndarmähnliche Eigenschaften entwickelt haben.

### 2.2 Toxinzugabe

Microcystin-LR (MC-LR) mit den Aminosäuren Leucin (L) und Arginin (R) an den Positionen 2 und 4 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) wurde beim Mediumwechsel zugegeben. Eine Stammlösung wurde zuvor angefertigt indem MC-LR in 100% Methanol gelöst wurde. Die Stammlösung wurde dem Medium so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 50 µM MC-LR und 0,5% Methanol entstand.

### 2.3 Barrierefunktion des Epithels

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) der Zellmonolayer erfolgte mit Chopstick-Elektroden und einem Volt-Ohmmeter (EVOM<sup>3</sup>; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) bei 37°C unter sterilen Bedingungen. Die gemessenen TER-Werte wurden für den Filterwiderstand (Leerwert) und die Filterfläche von 0,6 cm<sup>2</sup> korrigiert. Die Messungen des Fluxes des makromolekularen Markers Fluorescein (9 Å; 332 Da) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) von der apikalen zur basolateralen Zellseite wurden in 12-Well Platten durchgeführt. Hierfür wurden alle 15 min 300 µl Probenvolumen von der basalen Seite entnommen. Die Fluoreszenz wurde in einem Spektrophotometer (Tecan GmbH, Maennendorf, Schweiz) bestimmt. Anschließend wurde die Permeabilität für Fluorescein über Konzentrationsunterschiede berechnet.

## 2.4 Tight Junction-Proteinexpression im Western Blot

Veränderungen der Tight Junction-Proteinexpression wurden quantitativ durch Western Blot Analyse ermittelt. Die Zellen wurden zwei Mal in eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) gewaschen und mit Lysepuffer, zusammengesetzt aus 150 mM NaCl, 10 mM Trispuffer (pH 7,5), 0,5% Triton X-100, 1% SDS und Complete Proteasehemmer (Roche AG, Mannheim, Deutschland), lysiert. Lyalisierte Zellen wurden von den Filtern geschabt, in Reagenzröhrchen überführt und für 30 min auf Eis inkubiert mit wiederholtem Schütteln mittels Vortex. Anschließend wurde die Zelllösung für 30 min bei 15.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die Proteine wurden in ein 12,5% Polyacrylamidgel geladen. Die Primärantikörper für Claudin-1 (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Claudin-3 (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Claudin-4 (1:1000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin (1:10.000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden schwenkend über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG bzw. Ziege anti-Maus IgG (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) schwenkend für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteindetektion erfolgte nach Membraninkubation in SuperSignal West Pico PLUS stabiler Peroxidlösung (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Die Visualisierung der Proteine wurde mit einem Fusion FX System und Fusion FX6 Edge Software (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) durchgeführt. Die densitometrische Analyse erfolgte mit ImageJ Software (Version 1.48, NIH, USA).

## 2.5 Immunfärbung und *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie der Tight Junction-Proteine

Auf Filtern gewachsene Epithelzellen wurden mit PBS gewaschen und mit 2% Paraformaldehyd (PFA; Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Triton-X permeabilisiert und mit den Primärantikörpern für Claudin-1 (1:50; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Claudin-3 (1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Claudin-4 (1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und ZO-1 (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Sekundärantikörper, konjugiert an Abberior STAR RED und Abberior STAR ORANGE (1:200; Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland) für 105 min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. F-Aktin wurde mittels Phalloidin Abberior STAR RED (1:100; Abberior GmbH, Göttingen,



Deutschland) gefärbt. Die Zellfilter wurden nach der Inkubation gewaschen (3x PBS, 1x destilliertes Wasser) und auf Objektträgern platziert. Das Eindeckmedium (Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland) wurde auf 65°C erwärmt. Auf jeden Filter wurden 25 µl des Eindeckmediums pipettiert und zwei Filter wurden anschließend mit 2 STED-kompatiblen Deckgläsern (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) je Objektträger eingedeckt. Die Tight Junction Proteine wurden mit einem STED-Mikroskop (STED Abberior Facility Line, Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland) visualisiert.

## 2.6 Epithelialer Zelltod

Apoptosen wurden mit Hilfe eines TUNEL Assays (*In situ* Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Deutschland), durchgeführt nach Herstellerangaben, detektiert. Zellkerne wurden mit 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000; Roche, Basel, Schweiz) gefärbt. Die Apoptosen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM; Zeiss LSM510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) dargestellt. Apoptotische TUNEL-positive Zellen und alle Zellkerne wurden in einem Bildausschnitt mit geringer Vergrößerung gezählt, um die Apoptoserate zu berechnen. Zur Berechnung wurden jeweils 5 ähnliche Bildausschnitte in geringer Vergrößerung pro Filter ausgewertet (n=3).

## 2.7 Inhibitorversuche

21 Tage alte, auf Filtern konfluent gewachsene Caco-2 Zellen wurden in einer 24-Well Platte platziert. Zusatzfreies Medium wurde als Kontrolle verwendet. Zellen der MLCK-Inhibitorgruppe erhielten Medium mit dem spezifischen MLCK Pseudosubstrat Inhibitor D-reverse PIK (200 µM).(25) Das Medium wurde 30 min vor Inkubation mit 50 µM MC-LR zugegeben. Ein gleicher Versuchsaufbau wurde für die Untersuchung des Pan-Caspase-Inhibitors Q-VD-OPh Hydrat (10 µM; Calbiochem, San Diego, CA, USA) gelöst in DMSO angewendet. Lösungsmittelkontrollen wurden mit Methanol oder DMSO durchgeführt.

## 2.8 Statistische Analyse

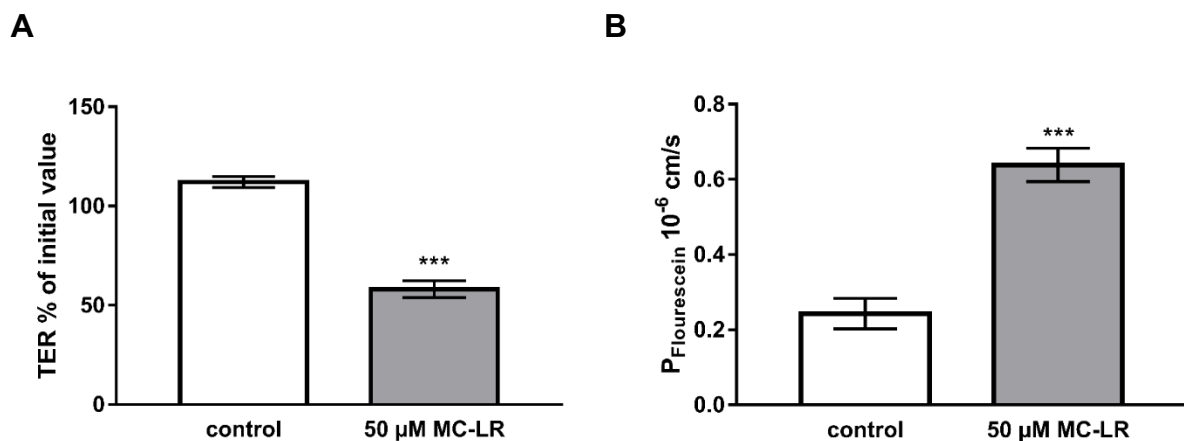
Alle präsentierten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 7.00, GraphPad

Inc., San Diego, CA, USA) unter der Verwendung des Student's *t*-Test mit Welch's Korrektur für den Vergleich zweier Gruppen.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## Ergebnisse

### 3.1 Epitheliale Barrierestörung durch Microcystin

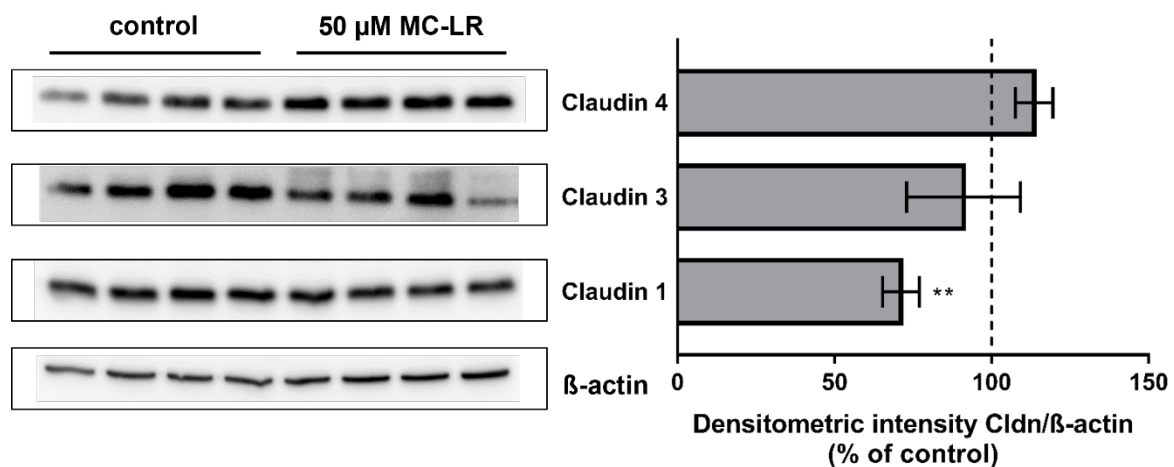
Der pathogene Effekt von Microcystin-LR (MC-LR) auf das intestinale Epithel und insbesondere seine barrierestörenden Eigenschaften wurden durch die Behandlung von Caco-2 Zellmonolayern und anschließender TER-Messung über 24 h analysiert. 4 h nach Behandlung mit MC-LR zeigten die Zellen TER-Werte von 94% bis 85% des Ursprungswertes mit 50  $\mu\text{M}$  MC-LR beziehungsweise von 95% bis 76% mit 100  $\mu\text{M}$  MC-LR, mit fallenden Widerständen im weiteren Verlauf und einem ausgeprägten Abfall des TER nach 24 h.(26) Eine Dosis von 50  $\mu\text{M}$  MC-LR reduzierte den TER auf die Hälfte des Ausgangswertes nach 24 h (Abbildung 3A).(26) Parallel dazu war die epitheliale Permeabilität für das 9 Å Markermolekül Fluorescein, stellvertretend für parazelluläre Molekülfluxe, mehr als verdoppelt (Abbildung 3B).(26) Die Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion scheint durch einen MC-LR-bedingten Leck-Flux-Mechanismus verursacht zu sein.



**Abbildung 3:** Transepithelialer Widerstand und Permeabilität von Caco-2 Zellmonolayern nach Behandlung mit MC-LR, (A) TER-Veränderung von Dünndarm-ähnlichen Caco-2 Zellmonolayern 24 h nach Behandlung mit Microcystin-LR (MC-LR),  $n=19-24$ . (B) Die Permeabilität für Fluorescein wurde 24 h nach MC-LR-Behandlung bestimmt,  $n=8$ , \*\*\* $P < 0,001$ , *t*-Test mit Welch's Korrektur. (aus Kaak et al., 2022 (26))

### 3.2 Reduktion des barrierebildenden Proteins Claudin-1 und Spaltung von Tight Junctions

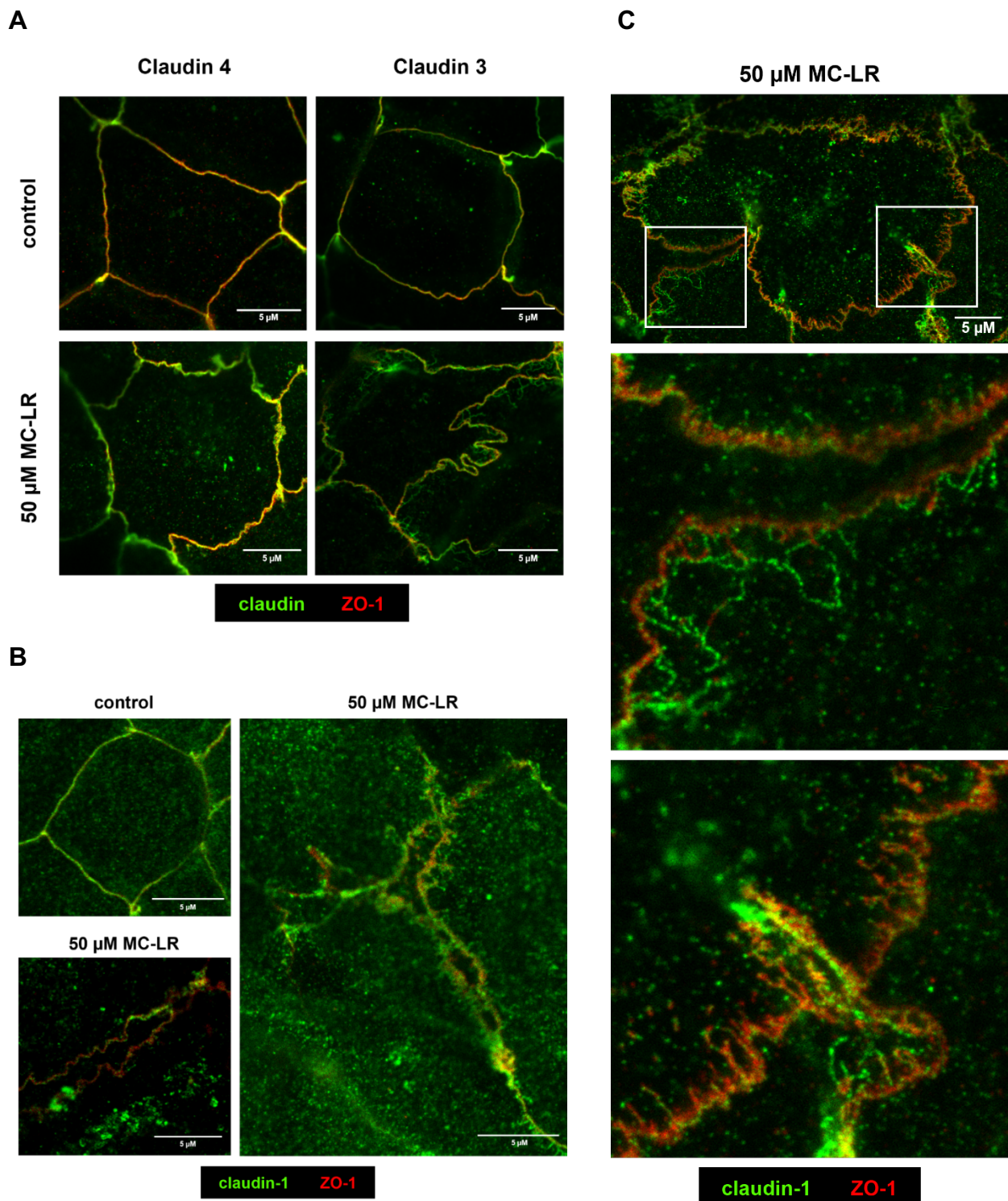
Die funktionelle Barrierereduktion des Epithels kann nicht nur als Folge zytotoxischer Effekte auftreten, sondern auch auf Veränderungen der TJ zurückzuführen sein. Veränderte Expressionen der barrierebildenden Claudine kommen hier als mögliches Ziel von MC-LR in Frage. Densitometrische Analysen von Western Blots von MC-LR-behandelten Caco-2 Zellen zeigten eine Reduktion von Claudin-1 um 29%.<sup>(26)</sup> Die Expression von Claudin-3 und Claudin-4 blieb jedoch unverändert (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Claudin-1, -3 und -4 Proteinexpressionslevel in Caco-2 Zellmonolayern nach Microcystin-LR-Behandlung, Veränderungen der Proteinexpression wurden durch Densitometrie in Western Blots von dünn darmähnlichen Caco-2 Zellmonolayern 24 h nach MC-LR-Behandlung bestimmt. n=4, \*\* $P < 0,01$ ,  $t$ -Test mit Welch's Korrektur. (aus Kaak et al., 2022 (26))

Da es unwahrscheinlich ist, dass allein die Veränderung von Claudin-1 zu einer ausgeprägten Barrierestörung führt, untersuchten wir weitere mögliche MC-LR-abhängige Pathomechanismen. Mittels eines hochauflösenden STED-Mikroskops analysierten wir morphologische Veränderungen der TJ, da dieses im Vergleich zur konventionellen Konfokalmikroskopie auch feinste zytopathogene Veränderungen über die subzelluläre Umverteilung der TJ-Proteine hinaus auflösen kann. Mit beiden Mikroskop-Typen konnte in mit MC-LR behandelten Zellen ein Herauslösen von Claudin-1 und Claudin-3 aus der TJ in Richtung intrazellulärer Aggregate gezeigt werden. Die höhere Auflösung des STED-Mikroskops ermöglichte eine genauere Beurteilung der TJ. So wurden ein Ausfransen der bizellulären TJ der Epithelzellen, sowie eine Aufspaltung entlang lateraler Membranen beobachtet, was letztendlich zu Zellablösungen führen kann.

Das wellenförmige Kräuseln und Ausfransen der bizellulären Verbindungen konnten in Co-Färbungen von ZO-1 mit Claudin-3 und Claudin-4 dargestellt werden (Abbildung 5A).<sup>(26)</sup> Caco-2 Zellmonolayer, die mit MC-LR behandelt wurden, zeigten in der Claudin-3-Färbung ein deutliches Ausfransen von TJ-Strängen, die einzeln sichtbar wurden.<sup>(26)</sup> Es fand eine Umstrukturierung von Claudin-3 an lateralen Membranen zu einem retikulären Geflecht statt.<sup>(26)</sup> Hier konnten verschiedene Stufen der TJ-Störung beobachtet werden. Dies deutet auch auf zytopathische, also auch zytoskelettbeeinflussende Effekte hin, welche wahrscheinlich ausschlaggebend für das Ausfransen der Claudine von ZO-1 sind und somit in der Aufspaltung der bizellulären TJ enden. Ein durchgehendes Auftrennen der TJ war in einer Färbung von ZO-1 zusammen mit Claudin-1 zu erkennen (Abbildung 5B&C). Wir waren somit in der Lage verschiedene Stufen der zytopathischen Effekte auf die TJ zu zeigen: von Kräuselungen der TJ über den Moment des Ausfransens bis hin zur Aufspaltung zweier aneinandergrenzenden Zellmembranen und somit zur Eröffnung des parazellulären Weges. Diese mikrostrukturellen Veränderungen spiegeln die elektrophysiologischen Ergebnisse eines Leck-Flux-Mechanismus als Diarrhömechanismus wider, der funktionell auch durch die gesteigerte Fluorescein-Permeabilität (siehe oben) gezeigt werden konnte. Die Beeinträchtigung der TJ resultiert in einem ionalen Leck-Flux und die Aufspaltung der bizellulären Membranen ermöglicht eine ungehinderte Passage von kleinen Molekülen und Antigenen.

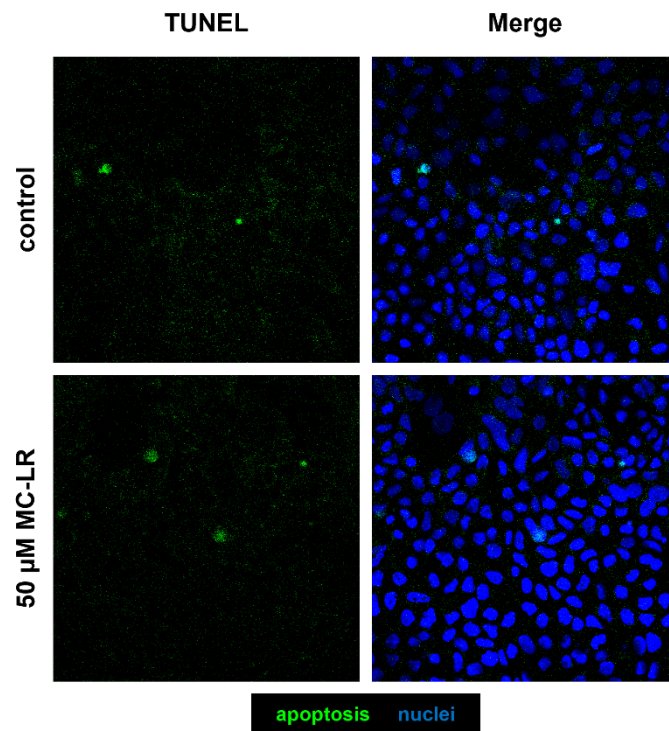


**Abbildung 5:** Immunfluoreszenzfärbung und STED-Mikroskopie von Caco-2 Zellmonolayern nach Microcystin-LR-Behandlung. Strukturelle Veränderungen an dünn darmähnlichen Caco-2 Zellmonolayern wurden 24 h nach Behandlung mit MC-LR mittels hochauflösender STED-Mikroskopie untersucht. Das Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) ist rot dargestellt. Claudin-1, -3, -4 sind grün dargestellt. (A) Es sind wellenförmige Kräuselungen und Ausfransungen in Färbungen von Claudin-3 und -4 sowie (B) Aufspaltungen der bizellulären Tight Junction in Claudin-1-Färbungen

zu sehen. (C) Vergrößerte Ausschnitte zeigen feine Strukturen der TJ in der STED-Mikroskopie. Größenbalken = 5  $\mu\text{m}$ . (aus Kaak et al., 2022 (26))

### 3.3 Induktion epithelialer Apoptose durch Microcystin

Zusätzlich zu den Veränderungen in der TJ-Morphologie, untersuchten wir die mögliche Beteiligung von Zelltodmechanismen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass epitheliale Apoptosen die Barrierefunktion eines Zellverbands negativ beeinflussen können. Daher führten wir ein TUNEL-Assay mit nachfolgender mikroskopischer Untersuchung und Apoptosequantifizierung durch. Das Verhältnis der apoptotischen Zellen war nach der Behandlung mit MC-LR verdoppelt bei 1,8% apoptotischen Zellen im Vergleich zu 0,7% in unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 6).(26) In einem Inhibitionsexperiment konnte der Apoptosehemmer Q-VD-OPh den TER-senkenden Effekt von MC-LR nicht verhindern. Über 24 h fiel der TER in den mit MC-LR behandelten Zellen auf  $84\pm 3\%$  des ursprünglichen Wertes und auf  $88\pm 4\%$  in den mit MC-LR und Q-VD-OPh behandelten Zellen ab (n.s.,  $n=5$ ,  $P=0,40$ ).(26) Rosettenbildungen nach apoptotischen Ereignissen konnte in MC-LR-behandelten Zellschichten beobachtet werden, was für eine intakte Wiederherstellungsfähigkeit von apoptotischen Lecks spricht. Die Beteiligung der Apoptoseinduktion an den barrierestörenden Eigenschaften von MC-LR scheint daher geringere Relevanz zu haben, als die beobachteten Veränderungen der TJ. Ein Mitwirken anderer Zelltodmechanismen wie Nekrose und Nekroptose sind aber nicht auszuschließen.

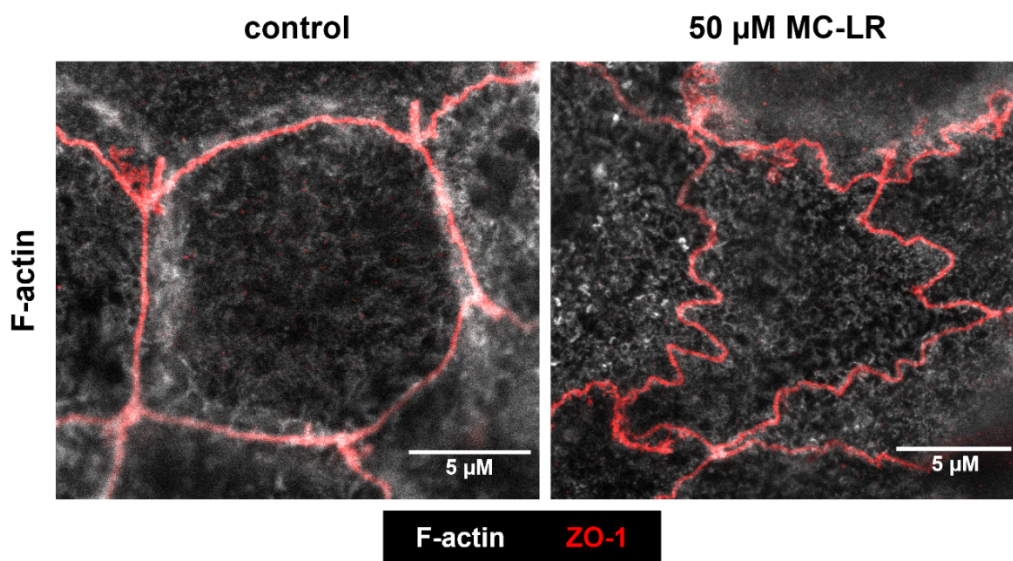


**Abbildung 6:** Apoptoseinduktion durch Microcystin-LR. Dünndarm-ähnliche Caco-2 Zellmonolayer wurden mit 50 µM MC-LR behandelt. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde nach 24 h mittels TUNEL-Färbung und anschließender Mikroskopie evaluiert. TUNEL-positive Zellen sind grün, mit DAPI gefärbte Nuklei blau dargestellt. (aus Kaak et al., 2022 (26))

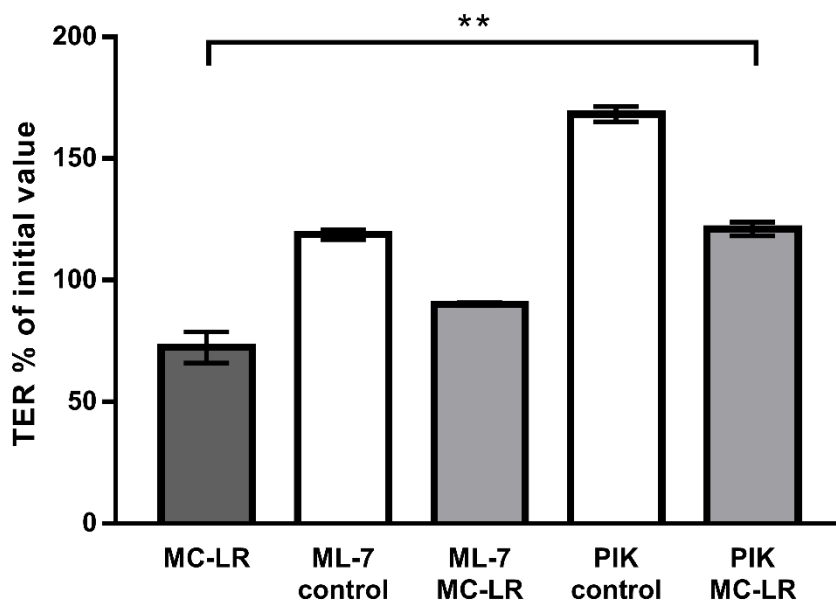
### 3.4 Zytoskelettale Veränderungen führen zur Tight Junction-Störung

Zellmorphologische Auffälligkeiten sind mit großer Wahrscheinlichkeit an zytoskelettale Veränderungen geknüpft. Eine mikroskopische Analyse von F-Aktin-gefärbten Caco-2 Zellmonolayern mittels STED-Mikroskopie zeigte in MC-LR-behandelten Zellen stärker kondensierte retikuläre Strukturen von F-Aktin in Verbindung mit TJ-Kräuselungen von ZO-1 im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 7A).(26) Die durch MC-LR bedingte Phosphataseinhibition führt zu einer Überphosphorylierung zellulärer Proteine und erschwert die Dephosphorylierung der Myosin-Light-Chain (MLC). Die ungehinderte Aktivität der MLC-Kinase (MLCK) verursacht eine Hyperphosphorylierung von MLC. Die barrierestörenden Auswirkungen von MC-LR auf das Zytoskelett konnten durch den spezifischen MLCK-Inhibitor D-reverse PIK gehemmt werden (Abbildung 7B).(26)

A



B



**Abbildung 7:** Analyse der Mikrostruktur und epithelialer Barrierefunktion von Caco-2 Zellmonolayern mittels Immunfluoreszenzfärbung und STED-Mikroskopie und TER-Messung nach Microcystin-LR-Behandlung. (A) Nach 24 h zeigen die behandelten Zellen stärker kondensiertes F-Aktin (weiß, F-actin). ZO-1 ist rot dargestellt und zeigt eine Wellenform der TJ in behandelten Zellen. Größenbalken = 5 µm. (B) In Inhibitorversuchen konnte der MLCK-Inhibitor ML-7 eine nicht-signifikante TER-Verbesserung in MC-LR-behandelten Zellmonolayern herbeiführen. Der spezifische MLCK-Inhibitor D-reverse PIK (PIK) hingegen konnte den TER-reduzierenden Effekt von MC-LR vollständig aufheben.  $n=4$ ,  $**P<0,01$ ,  $t$ -Test mit Welch's-Korrektur. (aus Kaak et al., 2022 (26))



## Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die hochauflösende STED-Mikroskopie konnten wir vorher nicht darstellbare strukturelle Veränderungen der TJ abbilden. Wir konnten zeigen, dass Microcystin-LR eine MLCK-vermittelte Barrierestörung durch Veränderungen der TJ verursacht. Ein Leck-Flux stellt hier den Hauptmechanismus der Toxin-induzierten Diarrhö dar. Diese neuen Erkenntnisse ermöglichen eine genauere Evaluation der gesundheitlichen Relevanz und Beurteilung der intestinalen Auswirkungen.

### 4.2 Gesundheitliche Auswirkungen von Cyanotoxinen

Die weltweite Häufung von gesundheitsgefährdenden, cyanobakteriellen Blüten ist unter anderem auf steigende globale Wassertemperaturen (27) und erhöhte Stickstoff- und Phosphatwerte durch industrielle und agrarwirtschaftliche Süßwasserverschmutzung zurückzuführen, vor allem durch Belastungen der Gewässer mit Gülle und Dünger.(9) Als Reaktion auf die hohen Phosphatkonzentrationen im Wasser produzieren Cyanobakterien Phosphataseinhibitoren wie MC-LR für ihre zelluläre Homöostase.(28) Mit Cyanobakterien verunreinigtes Wasser stellt eine gesundheitliche Gefährdung für Menschen und Tiere dar, die diese Gewässer nutzen. Besonders Tiere aus der Viehzucht wie Rinder, oder Haustiere wie Hunde sind besonders gefährdet. Aufgrund ihres Verhaltens kommen sie gehäuft mit Cyanobakterien in Kontakt. Beim Trinken oder Spielen und Baden in kontaminiertem Wasser ist die Gefahr einer akuten Vergiftung besonders hoch.(29) Gelegentlich werden Fälle einer tödlichen Vergiftung mit Cyanobakterien gemeldet, bei denen zumeist Hunde verstorben sind.(30) Die LD50 von Microcystin beträgt Berechnungen zufolge 50 µg/kg Körpergewicht.(2) Kommen Menschen hingegen mit belastetem Wasser in Kontakt (z.B. Hautkontakt oder Inhalation von Wassertropfen) treten meist Irritationen der Haut, Augen, Nase, Hals oder Lunge auf. Wird darüber hinaus das mit Cyanotoxin belastete Wasser verschluckt, kommt es zu intestinalen Symptomen wie Bauchschmerzen, Erbrechen, Diarrhö und ggf. nachfolgend Leberschäden. Zusätzlich können neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel und Muskelschwäche auftreten, wofür aber weitere toxinogene Moleküle der Cyanobakterien wie  $\beta$ -N-Methyla-

mino-L-Alanin (BMAA) verantwortlich sein können. Es bleibt eine Frage des wissenschaftlichen Diskurses, ob MC-LR der alleinige Auslöser einer Cyanobakterien-induzierten Diarrhö ist.

### 4.3 Intestinale Pathologien durch Cyanotoxine

Generell kann es nach der oralen Aufnahme von Cyanotoxinen zu intestinalen Effekten kommen wie i) einer Störung der epithelialen Integrität im Dünndarm, ii) einer Aufnahme der Toxine in die Mucosa und den Organismus, iii) der Induktion einer subepithelialen Entzündungsreaktion und iv) im weiteren Verlauf zu einer Anreicherung des Toxins in der Leber und damit verbunden zu zytotoxischen Effekten. Diese Ereignisse können durch eine gestörte epitheliale Barrierefunktion des Darms durch TJ-Veränderungen (z.B. Dislokation von Barriere-bildenden Claudinen aufgrund zytoskelettaler Konstriktion) und/oder Zelltodmechanismen (z.B. Apoptose-Induktion, Nekrose, Nekroptose, Pyroptose, Autophagie) begleitet oder ausgelöst werden. Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Pathomechanismen von MC-LR, um die von ihnen ausgelöste Diarrhö im Menschen besser charakterisieren zu können. Da es in der Literatur bisher keine detaillierte Beschreibung des Cyanotoxin-induzierten Diarrhömechanismus gibt, wird es notwendig sein, andere Mechanismen in Hinsicht auf sekretorische oder malabsorptive Störungen zu untersuchen. In unseren Messungen stellte sich in den ersten 24 h nach MC-LR Zugabe im Zellmodell eine Barriestörung heraus. In diesem Zeitrahmen scheint also die Barriestörung der Wirkmechanismus mit der höchsten Relevanz für die intestinale Symptomatik zu sein.

### 4.4 Epitheliale Barrieredysfunktion

Wir konnten zeigen, dass barrierebildende Claudine durch das Cyanotoxin MC-LR beeinflusst werden, was die Barriestörung in Caco-2 Zellmonolayern bedingt. Es entstand ein Leck-Flux (engl. *leak flux*), der sich funktionell durch einen TER-Abfall und einen Anstieg in der Permeabilität für Fluorescein zeigte. In anderen Studien konnte bereits ein barriestörender Effekt mittels TER-Messungen festgestellt werden.(31, 32) Dort wurde der TER-Abfall durch eine Expressionsminderung der Proteine Occludin und ZO-1 erklärt, jedoch fand bisher keine Untersuchung spezifischer Claudine statt, die die Barrierefunktion maßgeblich bestimmen.(31, 32) Daher haben wir uns in dieser Arbeit auf die

wichtigsten barrierebildenden Claudine fokussiert, um den funktionellen Barriereeffekt erklären zu können. Wir konnten in der Westernblotanalyse keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Claudin-3 und Claudin-4 feststellen, also derjenigen Claudine, die häufig im Darmepithel vertreten sind. Die Proteinexpression von Claudin-1 war dagegen um 29% reduziert, was ein molekulares Korrelat zur Barriestörung darstellt, die funktionelle Veränderungen aber nur teilweise erklären kann. Jedoch konnten wir über diesen Effekt hinaus zeigen, dass die subzelluläre Umverteilung der TJ-Proteine und die Störung der TJs durch Aufspaltung, wie wir es für Claudine und ZO-1 gezeigt haben, den Hauptgrund für die Beeinträchtigung der elektrophysiologisch messbaren Barrierefunktion darstellt.

Zusätzlich betrachteten wir die Deregulierung vom Einbau und Ausbau (*assembly / disassembly*) der TJ-Proteine in der apikalen Zellmembran als möglichen Pathomechanismus der Barriestörung, was durch eine Umverteilung der Claudine aus der TJ heraus im hochauflösenden STED-Mikroskop erstmals gezeigt werden konnte. Deutlich häufiger zeigte sich jedoch ein wellenförmiges Kräuseln der TJ als frühes Stadium der Toxinwirkung und ein Ausfransen der TJ-Stränge aus der Zellmembran heraus in Verbindung mit einer Aufspaltung der bizellulären TJ als letzte morphologische Veränderung. Als molekulares Korrelat hierzu sahen wir eine Aktomyosin-Kontraktion des Zytoskeletts, die zur TJ-Spaltung führte und den parazellulären Leck-Flux ermöglichte. Im Rahmen der untersuchten Barrieredysfunktion an Caco-2 Zellen durch MC-LR können die Ergebnisse eine Erklärung für die auftretende Diarrhö nach Cyanobakterien-Intoxikation liefern.

#### **4.5 Proteinphosphatase-Inhibition und Änderungen im Zytoskelett**

Die beobachteten Veränderungen an den apikalen Zellmembranen und das Herauslösen von Claudinen aus der TJ der Enterozyten scheinen mechanischer Natur zu sein, lassen sich jedoch durch aktivierte Zell-Signalwege erklären (z.B. MLCK-Signalweg). Phosphorylierung durch Kinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen spielen eine sehr wichtige Rolle in der Regulierung von kortikalem Aktin (bzw. des perijunctionalem Aktomyosin-Zytoskeletts). Die Verbindungen zwischen kortikalem Aktin und dem TJ-Protein ZO-1 führen durch Kontraktion zu der beobachteten Wellenform der Zellmembranen und führen schlussendlich zum Ausfransen der TJ und dem Herauslösen von Claudinen aus der TJ heraus. Dieser Mechanismus ist durch die Phosphatase-inhibierende Wirkung von

MC-LR naheliegend. Es kommt zu einer eingeschränkten Dephosphorylierung der MLC und die ungehinderte MLCK-Aktivität resultiert in einer Hyperphosphorylierung der MLC. MC-LR-behandelte Zellen zeigten in unseren STED-Mikroskopaufnahmen stärkere perijunctionale F-Aktin-Signale als Kontrollzellen. Dies spricht für eine retikuläre Kondensation von F-Aktin, einhergehend mit einer Konstriktion des Zytoskeletts, welche die Veränderungen der TJ verursacht. Morphologisch ähnliche Veränderungen der TJ konnten bereits in Caco-2-Zellen nach Aktivierung der MLCK in anderen Studien beobachtet werden.(33)

In vorangegangenen Arbeiten konnte in ähnlicher Weise gezeigt werden, dass das perijunctionale Zytoskelett auch über einen anderen Signalweg durch bakterielle porenformende Toxine (PFTs) beeinflusst werden kann. Die PFTs bilden in der apikalen Membran der Wirtszelle Poren, welche für z.B. Kalium und Kalzium durchlässig sind. Es wurde gezeigt, dass Aerolysin, ein PFT aus dem Gram-negativen enteropathogenen Bakterium *Aeromonas hydrophila*, in intestinalen HT-29/B6 Epithelzellen einen Kalziumeinstrom induziert, der durch ein nachfolgendes Kalzium-Signaling eine MLCK-aktivierte Konstriktion von Actomyosin auslöst und eine ausgeprägte Umverteilung von TJ-Proteinen verursacht.(34)

Allgemein betrachtet, kommt es durch die Einwirkung von Phosphataseinhibitoren wie MC-LR zur Aktivierung oder Hemmung zellulärer Signalwege wie der Proteinkinase C (PKC) oder Umformungen des Zytoskeletts, bedingt durch MLCK. Die Änderung der zellulären Phosphorylierung können über diese und andere Wege zu einer Schwächung der epithelialen Barriere führen. Auch kann die Barriere durch eine direkte Phosphorylierung der Claudine beeinträchtigt sein, wenn deren Zusammenbau durch die Proteinkinase A (PKA), einer Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase, die durch GTP-gebundenes RhoA (ROCK) oder MLCK aktiviert wird, gestört ist.(35) Alle diese Mechanismen sind mögliche Erklärungsansätze für die durch MC-LR-bedingte Inhibition der PP1 oder PP2A und bedürfen weiterer Überprüfung. Wird viel MC-LR in die Zelle aufgenommen, kommt es durch Überphosphorylierung unweigerlich zu Zellverlust durch Ablösen von Zellen aus dem Epithel oder durch Zelltod. In diesem Zusammenhang fanden wir eine doppelt so hohe Apoptoserate in behandelten Caco-2-Zellen, verglichen mit Kontrollzellen. Auch wenn eine Apoptoseinduktion barriere-relevant ist,(36) so scheint sie in unseren Experimenten bei einer Dosis von 50 µM MC-LR nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Apoptose-Rate von 1,8% in unseren Zellmonolayern noch nicht zur Barrierestörung beiträgt und erst bei höheren Werten Relevanz hat.(36) Wir konnten die Auswirkungen

der Apoptose-Induktion auf die Barrierefunktion verifizieren, indem wir Caco-2-Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh vor Zugabe von MC-LR behandelten. Der ausgeprägte TER-Effekt von MC-LR war in Zellen mit MC-LR und Q-VD-OPh genauso eindrücklich wie in Zellen, die nur mit MC-LR behandelt wurden. Wir konnten darüber hinaus Rosettenformierungen erkennen, die sich nach Apoptosen einzelner Zellen in den MC-LR-behandelten Monolayern bildeten. Die Rosettenbildung von vier bis fünf umliegenden Zellen ist ein Zeichen der schnellen Schließung apoptotischer Lecks. Dies spricht für eine intakte und funktionelle Restitution von Einzelzellläsionen durch die sogenannte *Purse-String-Formation*.(37, 38) Im Rahmen unserer Experimente spricht dies ebenfalls für eine untergeordnete Rolle der zytotoxischen Effekte bei den gewählten Toxinkonzentrationen. Einzelne apoptotische Ereignisse werden in Zellmonolayern durch ein Verteilen der restlichen Zellen kompensiert, wodurch diese in der mikroskopischen Aufsicht größer erscheinen. Dieser Effekt war auch in unseren mit MC-LR behandelten Caco-2-Zellen zu erkennen.

Der größte Anteil an der Barriereminderung und der TJ-Störung scheint auf die Veränderungen des Zytoskeletts zurückzuführen zu sein. Zur Überprüfung wurde ein Inhibitions-experiment durchgeführt. D-reverse PIK ist ein Polypeptid und ein spezifischerer Hemmer der MLCK als die Inhibitoren ML-7 oder ML-9. Durch die Behandlung der Zellen mit D-reverse PIK vor der Zugabe von MC-LR konnte der ausgeprägte TER-Effekt deutlich verhindert werden. Dies zeigt die Relevanz des MLCK-Signalweges und der darauffolgenden Zytoskelettänderungen im Rahmen des Barrieredefekts. In ähnlichen Studien wurde das für *Diarrheic Shellfish Poisoning* (DSP) verantwortliche Algentoxin Okadasäure untersucht. Dieses strukturell verschiedene Toxin inhibiert, wie MC-LR auch, die PP1 und PP2A und führte zu einem Barrieredefekt, der nicht durch den MLCK-Inhibitor ML-9 verhindert werden konnte.(39)

Da die MLC ein Substrat der PP1 ist, ist davon auszugehen, dass es durch die MC-LR-bedingte Inhibition der PP1 zu einem erhöhten Phosphorylierungs-Niveau der MLC in der Zelle kommt.(40) Die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A können mit über 50 Zielproteinen der Zelle interagieren und regulieren verschiedene Zellfunktion wie die Aktomyosinkontraktion oder die Stabilität der Microtubuli.(41-43) PP2A ist die wichtigste Phosphatase für Microtubuli-assoziierte Proteine wie CDC2 und CDC25. Die zentralen Kinasen Raf, MEK and Akt sind ebenfalls Substrate der PP2A und können auch die Barrierefunktion regulieren.(44)

Vorangegangene Arbeiten konnten entsprechend unseren Ergebnissen auch zeigen, dass Microtubuli, Intermediärfilamente und Aktin in Hepatozyten und Fibroblasten bereits 20 min nach der Behandlung mit MC-LR (10  $\mu$ M – 200  $\mu$ M) morphologische Veränderungen zeigen.(45) Die Auswirkungen eines offenen *Leak-Pathways* in unseren Caco-2 Zellmonolayern sind also von der Ausprägung der Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts abhängig, aber möglicherweise auch von weiteren Regulationen z.B. der Intermediärfilamente oder Veränderungen der Microtubuli.

#### 4.6 Stärken und Schwächen der Studie

##### Stärken

Wir verwendeten Caco-2-Zellen in unserem Zellmodell. Diese Zellen werden häufig zur Untersuchung epithelialer Veränderungen und zur Messung ihrer Barrierefunktion verwendet und bieten eine gute Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten, in denen diese Zellen verwendet wurden. Caco-2-Zellen entwickeln nach drei Wochen Dünndarm-Eigenschaften (SGLT1 Expression etc.) und stellen somit eines der wenigen humanen Dünndarmmodelle dar.

Wir kombinierten funktionelle Messungen, wie die Bestimmung des TER, mit molekularen Techniken, wie Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie. Dadurch konnten wir einen besseren Zusammenhang zwischen Barrierefunktion, Proteinverteilung und Strukturveränderungen herstellen und mögliche Diarrhömechanismen besser beurteilen.

Zusätzlich zur etablierten konfokalen CLSM, haben wir die Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung mit einem STED-Mikroskop dargestellt. Die STED-Mikroskopie ermöglicht eine deutlich höhere Auflösung und bessere Darstellbarkeit feiner Strukturen im Vergleich zur CLSM und wurde nach unserer Recherche erstmalig von uns im Zusammenhang mit Cyanotoxin-induzierten zellulären Veränderungen verwendet.

Durch die Zusammenarbeit mit Dr. Jerry Turner (Boston, USA) wurde uns ein sehr potenter MLCK-Inhibitor zur Verfügung gestellt. Mit D-reverse PIK konnten wir die Aktivität der MLCK gezielter inhibieren, da dieser Inhibitor viel spezifischer ist, als die kommerziell erwerblichen Inhibitoren wie ML-7 oder ML-9. Dies konnten wir auch in unseren Versuchen zeigen.

### Schwächen

Zusätzlich zu dem von uns untersuchten Signalweg der MLCK gibt es weitere Signalwege, die für den Cyanotoxin-induzierten Diarrhömechanismus relevant sein könnten. Hierzu zählen beispielsweise die Proteinkinasen MAPKK/MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), Proteinkinase B, Proteinkinase C und Rho/ROCK (Rho-associated protein kinase). Auch eine mögliche Beteiligung weiterer Zytoskelettveränderungen der Microtubuli oder Intermediärfilamente wurde im Rahmen unserer Arbeit nicht exploriert und könnte Grundlage weiterführender Forschung sein.

Wir haben keine Untersuchungen des Phosphostatus der MLC im Western Blot durchgeführt. Eine Beurteilung der Phosphorylierung vor und nach der Behandlung mit MC-LR und unter Behandlung mit dem MLCK-Inhibitor D-reverse PIK könnte einen zusätzlichen experimentellen Beweis liefern.

Unsere Versuche wurden ausschließlich mit reinem Cyanotoxin MC-LR durchgeführt. Die Verwendung ganzer Mikroorganismen würde die Untersuchung weiterer Effekte von Endo- und Exotoxinen wie Lipopolysacchariden (LPS) oder dem  $\beta$ -Methylamino-L-Alanin (BMAA) aus den Cyanobakterien ermöglichen.

Das von uns verwendete Epithelzellmodell verfügt im Gegensatz zum Tiermodell nicht über ein Immunsystem oder eine Blutzirkulation. Die Untersuchung eines nativen Darms würde hier wahrscheinlich eindeutiger Messergebnisse der Diarrhömechanismen liefern. Die durch uns am Caco-2 Modell dargestellten Pathomechanismen von MC-LR müssten an einem weiteren Zellmodell oder an einem Tiermodell auf ihre Gültigkeit und Übertragbarkeit auf den menschlichen Körper überprüft werden. Dennoch ist das Caco-2 Modell für die von uns untersuchten Mechanismen valide und wurde so auch in zahlreichen anderen Arbeiten verwendet. Somit ergeben sich aus den verschiedenen Schwächen Ansatzpunkte zur Validierung und Erweiterung unserer Ergebnisse.

### **4.7 Implikationen für zukünftige Forschung**

Im ersten Schritt ist die Überprüfung der Ergebnisse dieser Arbeit in weiteren Modellen sinnvoll. Hierfür bieten sich zum Beispiel das Epithelzellmodell HT-29 oder tierexperimentelle Studien in der Maus an. Ebenfalls könnten weitere zelluläre Veränderungen und Signalwege bedeutende Bestandteile zukünftiger Forschungsprojekte sein.

Auch weiterführende Grundlagenforschung der Zytoskelett- und TJ-Regulation durch Regulationsmechanismen der Proteinphosphatasen könnte relevante Ergebnisse liefern.

Ein neuartiger Ansatz zum Screening der relevanten Signalwege könnte zum Beispiel durch RNA-Sequenzierung von MC-LR-behandelten Zellen mit darauffolgender bioinformatischer Signalwegsanalyse erfolgen.

In Vorversuchen dieser Arbeit wurden initial auch andere Algentoxine untersucht. So könnte die Relevanz der von uns identifizierten Pathomechanismen auch für Nodularin (aus *Nodularia* spp.) oder Okadasäure (aus Dinoflagellaten) überprüft werden, da diese eine ähnliche Wirkung über Phosphatase-Hemmung vermitteln.

Aus dem aktuell begrenzten Wissensstand ergeben sich vorerst nur limitierte Therapieoptionen. Wir konnten leider keine Behandlungsleitlinien zur Therapie einer Cyanotoxinintoxikation finden. Die Verwendung eines Absorbers wie Aktivkohle könnte jedoch Toxine absorbieren und so die Symptomatik eventuell reduzieren. Eine Anwendung von hemmenden oder aktivierenden Substanzen, die den Phosphorylierungsstatus der Zellen beeinflussen, erfordert weiterführende Forschung. Durch die zeitlich versetzte Aufnahme von Toxin und potentieller Arznei scheint eine zufriedenstellende Symptomlinderung unwahrscheinlich. Ein Vorgehen wie bei anderen chemischen Vergiftungen scheint somit am sinnvollsten. Es sollte auf Milchprodukte verzichtet werden, da MC-LR lipophile Eigenschaften aufweist und ein Adsorptionsversuch mit Aktivkohle in angemessener Dosis (0,5 – 1 g / kg Körpergewicht) eingeleitet werden.(46)

Nach weiterführender Forschung am Zell- und Tiermodell könnten klinische Toxikologiestudien zur human- und veterinärmedizinischen Intervention bei Blaualgenvergiftungen angestrebt und entsprechende Leitlinien erarbeitet werden.

## Schlussfolgerungen

*Microcystis* spp. enthalten unter anderem MC-LR, ein Cyanotoxin, das nach dem Zerfall der bakteriellen Zellmembran freigesetzt wird. Durch eine versehentliche, orale Aufnahme von Cyanobakterien können potentiell große Mengen an MC-LR in den Verdauungstrakt gelangen. Durch intakt verschluckte Cyanobakterien könnten somit verschiedene Toxine auch in unmittelbarer Nähe zur Dünndarmmukosa freigesetzt werden. Unsere Untersuchungen ergaben, dass MC-LR in Dosierungen im unteren Wirkspektrum zytopathische Veränderungen des Zytoskeletts und der TJ bewirkt und in höherer Konzentration vermehrt Zelltodmechanismen induziert.(47) Es ist jedoch auch möglich, dass der Großteil der Cyanobakterien bereits im Magen abgetötet wird und das dort freigesetzte Toxin stark verdünnt wird. Die somit geringeren Konzentrationen führen zu den von



uns beobachteten zytopathischen Effekten im Darm und wirken später durch Akkumulation in der Leber dort zytotoxisch. Die Interaktion von niedrigen und hohen Dosierungen von MC-LR sollte in zukünftigen Forschungsprojekten weiter untersucht werden.

Im Rahmen der massiven Phosphorylierung der Dünndarmenterozyten könnten auch eine Malabsorption oder eine aktive Sekretion von Ionen induziert werden. Diese potentiell Signalweg-beeinflussenden Mechanismen und ihre Auswirkung auf epitheliale Transportfunktionen muss ebenfalls noch erforscht werden.

Unter Betrachtung unserer Ergebnisse induziert MC-LR in Dünndarm-ähnlichen Caco-2 Zellen eine Konstriktion des kortikalen Zytoskeletts. Die damit einhergehende Beeinträchtigung der TJs führt zu einer Barrierestörung des Epithels. Eine Diarrhö durch Aufnahme von mit *Microcystis*-belastetem Wasser kann somit durch den entstandenen Leck-Flux-Mechanismus erklärt werden.

## Literaturverzeichnis

1. Sinha RP, Häder D-P. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*. 2008;174(3):278-89.
2. Hunter PR. Cyanobacteria and human health. *Journal of Medical Microbiology*. 1992;36(5):301-2.
3. Liberton M, Page LE, O'Dell WB, O'Neill H, Mamontov E, Urban VS, Pakrasi HB. Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *J Biol Chem*. 2013;288(5):3632-40.
4. Fay P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol Rev*. 1992;56(2):340-73.
5. Whitton BA, SpringerLink. *Ecology of cyanobacteria II : their diversity in space and time*. 2nd ed. Dordrecht ; New York ; London: Springer; 2012.
6. Schirrmeister BE, de Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(5):1791-6.
7. Chorus I, Bartram J, World Health O. *Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London ; New York: E & FN Spon; 1999.
8. Paerl HW, Fulton RS, 3rd, Moisaner PH, Dyble J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *ScientificWorldJournal*. 2001;1:76-113.
9. Paerl H. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. *Adv Exp Med Biol*. 2008;619:217-37.
10. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria--a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health*. 2006;5:6.
11. Francis G. Poisonous Australian Lake. *Nature*. 1878;18(444):11-2.
12. Miller MA, Kudela RM, Mekebri A, Crane D, Oates SC, Tinker MT, Staedler M, Miller WA, Toy-Choutka S, Dominik C, Hardin D, Langlois G, Murray M, Ward K, Jessup DA. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS One*. 2010;5(9).

13. Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*. 2002;181-182:441-6.
14. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*. 1996;17(6):1317-21.
15. McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203(3):219-30.
16. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
17. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res*. 2015;13(1):11-8.
18. Sanchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martinez-Augustin O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(12):2394-404.
19. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):3-20; quiz 1-2.
20. Lobo de Sa FD, Schulzke JD, Bucker R. Diarrheal Mechanisms and the Role of Intestinal Barrier Dysfunction in *Campylobacter* Infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2021;431:203-31.
21. Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203(3):257-63.
22. MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett*. 1990;264(2):187-92.
23. Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG. Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*. 1989;337(6202):78-81.
24. Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int J Mol Sci*. 2010;11(1):268-87.

25. Owens SE, Graham WV, Siccardi D, Turner JR, Mrsny RJ. A strategy to identify stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase. *Pharm Res.* 2005;22(5):703-9.
26. Kaak JL, Lobo de Sa FD, Turner JR, Schulzke JD, Bucker R. Unraveling the intestinal epithelial barrier in cyanotoxin microcystin-treated Caco-2 cell monolayers. *Ann N Y Acad Sci.* 2022.
27. Gobler CJ. Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae.* 2020;91:101731.
28. Holland A, Kinnear S. Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Mar Drugs.* 2013;11(7):2239-58.
29. Beasley VR, Cook WO, Dahlem AM, Hooser SB, Lovell RA, Valentine WM. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1989;5(2):345-61.
30. Lurling M, Faassen EJ. Dog poisonings associated with a *Microcystis aeruginosa* bloom in the Netherlands. *Toxins (Basel).* 2013;5(3):556-67.
31. Zhou Y, Xu X, Yu B, Yu G. Characterization of in vitro effects of microcystin-LR on intestinal epithelial cells. *Environ Toxicol.* 2017;32(5):1539-47.
32. Zhou Y, Xue M, Jiang Y, Zhang M, Wang C, Wang X, Yu G, Tang Z. Beneficial Effects of Quercetin on Microcystin-LR Induced Tight Junction Defects. *Front Pharmacol.* 2021;12:733993.
33. Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 10):2095-106.
34. Bucker R, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Fromm A, Zeitz M, Chakraborty T, Fromm M, Epple HJ, Schulzke JD. Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* perturbs tight junction integrity and cell lesion repair in intestinal epithelial HT-29/B6 cells. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1283-92.
35. González-Mariscal L, Garay E, Quirós M. Chapter 6 - Regulation of Claudins by Posttranslational Modifications and Cell-Signaling Cascades. In: L. Yu AS, editor. *Current Topics in Membranes.* 65: Academic Press; 2010. p. 113-50.
36. Butkevych E, Lobo de Sa FD, Natramilarasu PK, Bucker R. Contribution of Epithelial Apoptosis and Subepithelial Immune Responses in *Campylobacter jejuni*-Induced Barrier Disruption. *Front Microbiol.* 2020;11:344.

37. Florian P, Schoneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH. Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol*. 2002;545(2):485-99.
38. Gunzel D, Florian P, Richter JF, Troeger H, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH. Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(6):R1496-507.
39. Tripuraneni J, Koutsouris A, Pestic L, De Lanerolle P, Hecht G. The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology*. 1997;112(1):100-8.
40. Ma P, Foote DC, Sinnamon AJ, Brass LF. Dissociation of SHP-1 from spinophilin during platelet activation exposes an inhibitory binding site for protein phosphatase-1 (PP1). *PLoS One*. 2015;10(3):e0119496.
41. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 2):241-56.
42. Oliver CJ, Terry-Lorenzo RT, Elliott E, Bloomer WA, Li S, Brautigan DL, Colbran RJ, Shenolikar S. Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol*. 2002;22(13):4690-701.
43. Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG. Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem*. 1998;273(34):21901-8.
44. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci*. 1999;24(5):186-91.
45. Wickstrom ML, Khan SA, Haschek WM, Wyman JF, Eriksson JE, Schaeffer DJ, Beasley VR. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicol Pathol*. 1995;23(3):326-37.
46. Müller D, Desel H. Ursachen, Diagnostik und Therapie häufiger Vergiftungen. *Dtsch Arztebl International*. 2013;110(41):690-700.
47. Chen L, Xie P. Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(13):1018-31.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan-Leo Kaak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Störung der intestinalen epithelialen Barrierefunktion durch Microcystin in Caco-2-Zellen / Intestinal epithelial barrier dysfunction by microcystin in Caco-2 cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Jan-Leo Kaak hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Kaak JL, Lobo de Sa FD, Turner JR, Schulzke JD, Bücken R. Unraveling the intestinal epithelial barrier in cyanotoxin microcystin-treated Caco-2 cell monolayers. Ann N Y Acad Sci. 2022, 1516(1), 188-196.

Beitrag im Einzelnen (ausführlich): Literaturrecherche zu 85%, Konzeption und Design der Versuche (50% Jan-Leo Kaak, 30% Dr. Roland Bücken, 10% Dr. Jerrold R Turner, 10% Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke), Durchführung der Versuche u.a. Membranintegrität (transepithelialer Widerstand, Permeabilität via Fluoresceinflux) und der Inhibitorversuche (70 % Jan-Leo Kaak, 15% Dr. Fábía Daniela Lobo da Fonseca de Sá, 15% Dr. Roland Bücken) und vollständige Mikroskopie, Anzuchten der Zellkultur und Behandlung dieser mit Toxin, Datenerhebung: Messungen der Widerstände und Molekül-Permeabilitäten (90% Jan-Leo Kaak, 10% Fábía Daniela Lobo da Fonseca de Sá), Anfertigen der Immunfluoreszenzpräparate (100 % Jan-Leo Kaak), Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen (90% Jan-Leo Kaak, 10% Dr. Roland Bücken), Auswertung und Interpretation der Daten (60% Jan-Leo Kaak, 30% Dr. Roland Bücken, 10% Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke), Anfertigen der Grafiken und Abbildungen Figure 1 (komplett), Figure 2 (komplett), Figure 3 (komplett), Figure 4 (komplett) und Figure 5 (komplett) der Publikation, Anfertigung des Manuskripts des Papers zu 50% in Zusammenarbeit mit Dr. Roland Bücken.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

DOI: 10.1111/nyas.14870

ORIGINAL ARTICLE

**ANNALS** OF THE NEW YORK  
ACADEMY OF SCIENCES

# Unraveling the intestinal epithelial barrier in cyanotoxin microcystin-treated Caco-2 cell monolayers

 Jan-Leo Kaak<sup>1</sup> | Fábía D. Lobo de Sá<sup>1</sup> | Jerrold R. Turner<sup>2</sup>  | Jörg-Dieter Schulzke<sup>1</sup> | Roland Bücke<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Infectious Diseases and Rheumatology, Clinical Physiology/Nutritional Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Laboratory of Mucosal Barrier Pathobiology, Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

## Correspondence

Roland Bücke, Klinische Physiologie, Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Arbeitsbereich Ernährungsmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany.  
Email: roland-felix.buecker@charite.de

## Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Numbers: GRK 2318-2 C1, Schu 559/11-5; National Institutes of Health, Grant/Award Number: R01 DK068271

## Abstract

Microcystin is a widespread cyanobacterial toxin that affects the intestine to produce diarrheal symptoms after ingestion of freshwater blue-green algae. Our study aimed to characterize the mechanism by which the toxin leads to diarrhea via epithelial barrier dysfunction in a small intestine Caco-2 cell model. Microcystin-treated human Caco-2 epithelial monolayers were functionally and molecularly analyzed for barrier dysfunction. Tight junctions (TJs) and cell damage were analyzed in relation to transepithelial electrical resistance (TER) changes. TER of microcystin-treated Caco-2 cells was reduced by 65% of the initial value after 24 h; concomitantly, permeability for fluorescein increased 2.6-fold. Western blot analysis showed reduced claudin-1 expression, while expression of claudin-3 and -4 remained unchanged. Super-resolution stimulated emission depletion microscopy revealed that TJ integrity was compromised by fraying and splitting of the TJ domain of the epithelial cells. Epithelial apoptosis did not significantly contribute to epithelial barrier dysfunction, while cytoskeletal actomyosin constriction was associated with TJ disintegration and the barrier defect. Our results indicate that microcystin causes intestinal barrier leakiness, which helps to explain the leak flux type of diarrhea as the main pathomechanism after ingestion of cyanobacterial toxin.

## KEYWORDS

actin, apoptosis, claudin, MLCK, PIK, tight junction

## INTRODUCTION

Hazardous algal blooms formed by cyanobacteria pose an emerging threat to the health of humans and animals, such as birds, mammals, and the aquatic life.<sup>1</sup> For humans, poisoning frequently causes gastrointestinal symptoms. This occurs after ingestion of surface freshwater from lakes contaminated with cyanobacterial toxins during blooms of blue-green algae. When contaminated water is swallowed, short-term illness is associated with symptoms, such as

stomach pain, nausea, vomiting, and diarrhea. In rare cases, it can lead to fatal liver failure after large amounts are ingested. Long-term exposure to cyanobacterial toxins may lead to the development of liver cancer.<sup>2</sup> Cyanotoxins, in particular microcystins, are mainly isolated from *Microcystis aeruginosa*, but also other *Microcystis* spp. and additional cyanobacterial genera. These toxins have been shown to act as hepatotoxins and have been proposed to be inducers of gastrointestinal disorders.<sup>3,4</sup> However, the diarrheal mechanism of the common cyanotoxin microcystin, and its action on the epithelial

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Annals of the New York Academy of Sciences* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of New York Academy of Sciences.



transport and/or barrier function in the small intestine, remain unclear.

The aim of our study here was to evaluate the involvement of possible barrier dysfunction as the diarrheal mechanism from microcystin poisoning. As a main structure for epithelial barrier function, we examined the important barrier-forming claudins of the tight junction (TJ). TJ integrity changes and epithelial cell death events have been discussed to be responsible for the diarrheal outcome after microcystin ingestion.

One of the affected target organs of the toxins is the upper gastrointestinal tract, where uptake of microcystin in the small intestine occurs through the apical cell membranes both receptor-independently and via organic anion transporting polypeptide receptor-dependent uptake mechanisms in liver cells.<sup>5</sup> Microcystins are cyclic heptapeptides that exhibit toxic effects based on the inhibition of protein phosphatases PP1 and PP2A.<sup>6</sup> Surprisingly, other toxins from marine dinoflagellates, such as okadaic acid, have different structures yet also affect PP1 and PP2A.<sup>7</sup> After uptake of these toxins, target cells experience overphosphorylation that causes cytopathic effects via cytoskeleton alterations and, ultimately, cytotoxic outcome.<sup>8</sup> It is conceivable that direct phosphorylation of TJ proteins leads to increased stability of TJ proteins in the membrane and enhances barrier function; alternatively, phosphatase inhibition may potentiate signaling by kinases, for example, myosin light-chain kinase (MLCK), that triggers cytoskeletal actomyosin constriction and negatively affects TJ integrity and the epithelial barrier.

In the present study, we characterized the possible mechanisms, such as leak flux induction by disruption of the intestinal epithelial barrier with respect to the modulation of barrier-maintaining claudins in a small intestinal Caco-2 cell model.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The human colon carcinoma cell line Caco-2 was cultured in minimum essential media – with Glutamax-1 supplementation with 15% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin (all: Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in 25 cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Corning, Corning, NY, USA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were fed three times per week for 14–21 days and were then seeded on Millicell PCF filters (0.4 μm pore size; Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Experiments started 21 days after seeding when the cells developed small intestine-like properties and reached confluency.

### Toxin treatment

Microcystin-LR (MC-LR, with amino acids leucine [L] and arginine [R] at positions 2 and 4 [Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA]) treatment was performed by medium change. MC-LR stock was dissolved in 100% methanol. Stock solution was added to the medium resulting in a final concentration of 50 μM of MC-LR and 0.5% methanol.

### Epithelial barrier function

The measurement of transepithelial electrical resistance (TER) of the cell monolayer was performed with chopstick electrodes and a Volt-Ohm meter (EVOM3; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) under sterile conditions at 37°C. Measured TER values were corrected for the resistance of the empty filter and the growth area of 0.6 cm<sup>2</sup>. Measurements of macromolecule fluxes of fluorescein (9 Å; 332 Da) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) from apical to basolateral compartment were performed in 12-well plates. Samples were taken every 15 min from the basal side. Fluorescence was measured in a spectrophotometer (Tecan GmbH, Maennendorf, Switzerland) and permeability of fluorescein was calculated by flux over concentration differences.

### TJ protein expression by Western blot

Changes in TJ protein expression were quantified by Western blot analysis. Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (Gibco, Life Technologies) and lysed with whole cell lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris buffer (pH 7.5), 0.5% Triton X-100, 1% SDS, and Complete Protease Inhibitor (Roche AG, Mannheim, Germany). Lysed cells were scraped from the filters, transferred to reaction tubes, and incubated for 30 min on ice with vortexing in between and centrifuged afterward for 30 min at 15,000 × *g* at 4°C. Proteins were loaded on 12.5% polyacrylamide gels. Primary antibodies claudin-1 (1:1000; Invitrogen, Carlsbad CA, USA), claudin-3 (1:1000; Invitrogen), claudin-4 (1:1000; Invitrogen), and, as loading control, β-actin (1:10,000; Sigma Aldrich) were incubated over night at 4°C. The following day, peroxidase-conjugated secondary antibody, either goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK), was incubated for 2 h at room temperature. Detection of proteins was performed by membrane incubation with SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Visualization of proteins was by the Fusion FX imaging system and Fusion FX6 Edge software (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany), and densitometry was performed using ImageJ software.

### Immunostaining and stimulated emission depletion microscopy of TJ proteins

Epithelial cells grown on filters were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Primary antibodies were claudin-1 (1:50; Invitrogen), claudin-3 (1:100; Invitrogen), claudin-4 (1:100; Invitrogen), and ZO-1 (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and secondary antibodies were conjugated to Abberior STAR RED and Abberior STAR ORANGE (1:200; Abberior GmbH, Göttingen, Germany), F-actin was stained using Phalloidin Abberior STAR RED (1:100; Abberior GmbH) and incubated 105 min at 37°C. After incubation of the cell monolayers, filters

were washed (3x PBS, 1x distilled water) and placed on slides. Mounting medium (Abberior GmbH) was heated to 65°C. Mounting medium (25  $\mu$ l) was placed on each filter and then, a stimulated emission depletion (STED)-compatible cover slide (Carl Zeiss, Jena, Germany) was placed on each filter; two filters were mounted per slide. TJ protein localization was visualized using a STED microscope (STED Abberior Facility Line, Abberior GmbH).

### Epithelial cell death

Apoptotic events were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (In situ Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany), performed according to the manufacturer's instructions. Nuclei were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000; Roche, Basel, Switzerland). Apoptotic events were visualized using confocal laser-scanning microscopy (CLSM; Zeiss LSM510). Apoptotic TUNEL-positive cells and all nuclei in a low-power field were counted to calculate the ratio of apoptosis. The number of apoptotic events was estimated in five low-power fields per sample.

### Inhibitor studies

Three-week-old Caco-2 cells grown on filter supports were placed in a 24-well plate. Plain medium was used as control. MLCK inhibition groups received medium containing the specific MLCK pseudosubstrate inhibitor D-reverse PIK (DrPIK, 200  $\mu$ M).<sup>9</sup> Medium was added 30 min prior to incubation with 50  $\mu$ M of MC-LR. In further experimental series, the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh hydrate (10  $\mu$ M; Calbiochem, San Diego, CA, USA) dissolved in DMSO was applied. Solute controls were performed with methanol or DMSO.

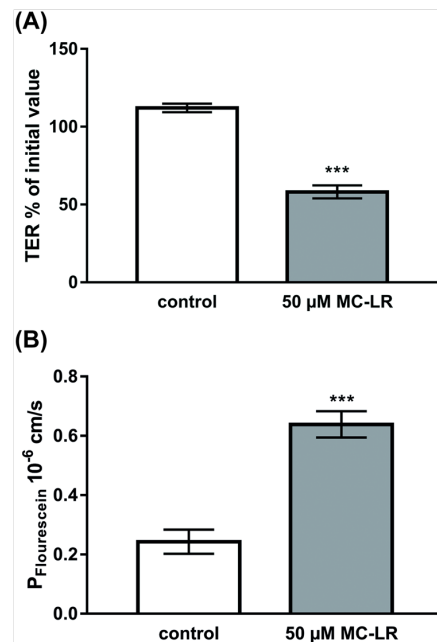
### Statistical analysis

All data are presented as mean values  $\pm$  standard error of the mean, and statistical analysis was performed using GraphPad Prism software using Student's *t*-test with Welch's correction for comparison of two groups.  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Epithelial integrity is impaired by microcystin

The pathogenic impact of MC-LR with respect to barrier breaking of intestinal epithelia was analyzed by treatment of Caco-2 cell monolayers and TER measurements over 24 h; at 4 h after treatment, TER values range from 94% to 85% or 95% to 76% of the initial values with 50 or 100  $\mu$ M MC-LR, respectively. Thereafter, TER further declined



**FIGURE 1** Epithelial barrier function in Caco-2 monolayers 24 h after microcystin-LR treatment. (A) Small intestine-like Caco-2 cell monolayers were measured for TER changes after treatment with microcystin-LR (MC-LR),  $n = 19$ – $24$ , and (B) the permeability for fluorescein was assessed 24 h after treatment,  $n = 8$ , \*\*\* $p < 0.001$ , *t*-test with Welch's correction.

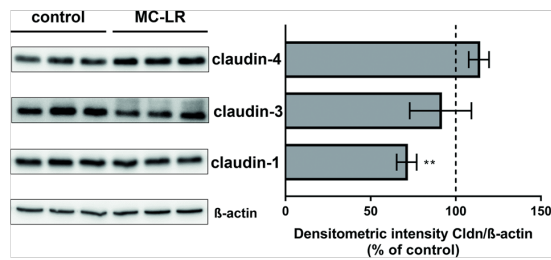
to a pronounced TER drop at 24 h. Fifty micromoles MC-LR reduced TER to half of the initial value after 24 h (Figure 1A). Concomitantly, epithelial permeability for the 9 Å paracellular flux marker molecule fluorescein more than doubled (Figure 1B).

### Barrier-forming claudin-1 is downregulated, and TJs are disrupted

The barrier effect of MC-LR may be due to epithelial leaks resulting from cytotoxic effects on epithelial cells, but it can also be based on disseminated TJ changes. Altered expression of barrier-forming claudins could be a potential target of MC-LR.

In densitometric analysis of Western blots from MC-LR-treated Caco-2 cells, protein expression of claudin-1 was reduced by 29% (Figure 2), while the expression of claudin-3 and -4 remained unchanged. Because protein expression change of claudin-1 alone seemed unlikely to fully explain the drop in epithelial resistance, we looked for other MC-LR-dependent pathomechanisms by analyzing TJ morphology by super-resolution STED microscopy: in contrast to conventional confocal laser-scanning microscopy, STED microscopy can resolve even subtle cytopathogenic effects beyond the subcellular redistribution of TJ proteins.

With both laser-scanning and STED microscopy, a redistribution of claudin-1 and -4 off the TJ toward intracellular aggregates was visible



**FIGURE 2** Claudin-1, -3, and -4 protein expression levels in Caco-2 monolayers 24 h after microcystin-LR treatment. Changes in protein expression were assessed by densitometry in Western blots from small intestine-like Caco-2 cell monolayers after 24 h of treatment with MC-LR;  $n = 4$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $t$ -test with Welch's correction.

in MC-LR-treated cells (Figure 3). In addition, with STED microscopy, more cytopathogenic changes were observed, including fraying and undulating of the bicellular TJ domains of the epithelial cells, as well as the separation of TJs along lateral membranes, leading to cell detachment. The "split cell" phenotype was sporadically distributed in the observed areas of treated monolayers, whereas no detached cells were found in control cells.

Fraying and undulations of bicellular TJs were observed after microcystin exposure based on the distributions of ZO-1, claudin-3, and claudin-4 (Figure 3A). Claudin-3 was redistributed into a mesh-like network at lateral membranes. This also suggests that microcystin may have cytopathic effects on the cytoskeleton and that this may be the mechanism underlying the morphologic changes observed. An example of complete retraction at a bicellular TJ is depicted in the staining of ZO-1 together with claudin-1 (Figure 3). Thus, we depicted the pathogenic action on barrier function in a fraying TJ stage, before TJ split up and the separation of cell membranes of adjacent cells (Figure 3C). Undulating TJs were displayed in detail in respect to the comparison between CLSM and STED imaging (Figure 3D). In microscopic overviews ( $125 \times 125 \mu\text{m}$ )  $\sim 60$ – $80$  cells per frame were counted of which  $3.3 \pm 0.6\%$  showed undulations of the TJ in controls, whereas after treatment with MC-LR,  $52.5 \pm 2.2\%$  of the cells showed the undulating phenotype ( $p < 0.001$ ,  $n = 5$ ).

### Epithelial apoptosis induction by microcystin

The physical separation between cells raises the possibility of cytotoxicity. We, therefore, evaluated cell death, which has been shown to either have no effect or to reduce epithelial barrier function, depending on the specific experimental system. TUNEL demonstrated a modest increase in cells with fragmented DNA (Figure 4A), from 0.7% in control monolayers to 1.8% apoptotic cells in MC-LR-treated monolayers (Figure 4B). However, the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh was unable to prevent MC-LR-induced TER loss over 24 h with  $84 \pm 3\%$  of the initial TER in MC-LR versus  $88 \pm 4\%$  in MC-LR and Q-VD-OPh-treated cells (n.s.,  $n = 5$ ,  $p = 0.40$ ). Notably, rosette formation at sites of cell extrusion confirms the presence of apoptotic events in MC-LR-treated

monolayers as well as intact restitution responses during extrusion (Figure 4C).

### Cytoskeletal disorganization leads to TJ disruption

The MLCK inhibitor PIK is capable to restore normal TJ profiles. The stable PIK analog DrPIK could protect monolayers from MC-LR-induced barrier loss and restore normal TJ morphology. Although incomplete, DrPIK markedly attenuated MC-LR-induced barrier loss (Figure 5A). More strikingly, DrPIK restored smooth TJ F-actin and ZO-1 profiles (Figure 5B). Thus, the significant fraction of the barrier loss induced by MC-LR reflects cytoskeletal TJ regulation.

## DISCUSSION

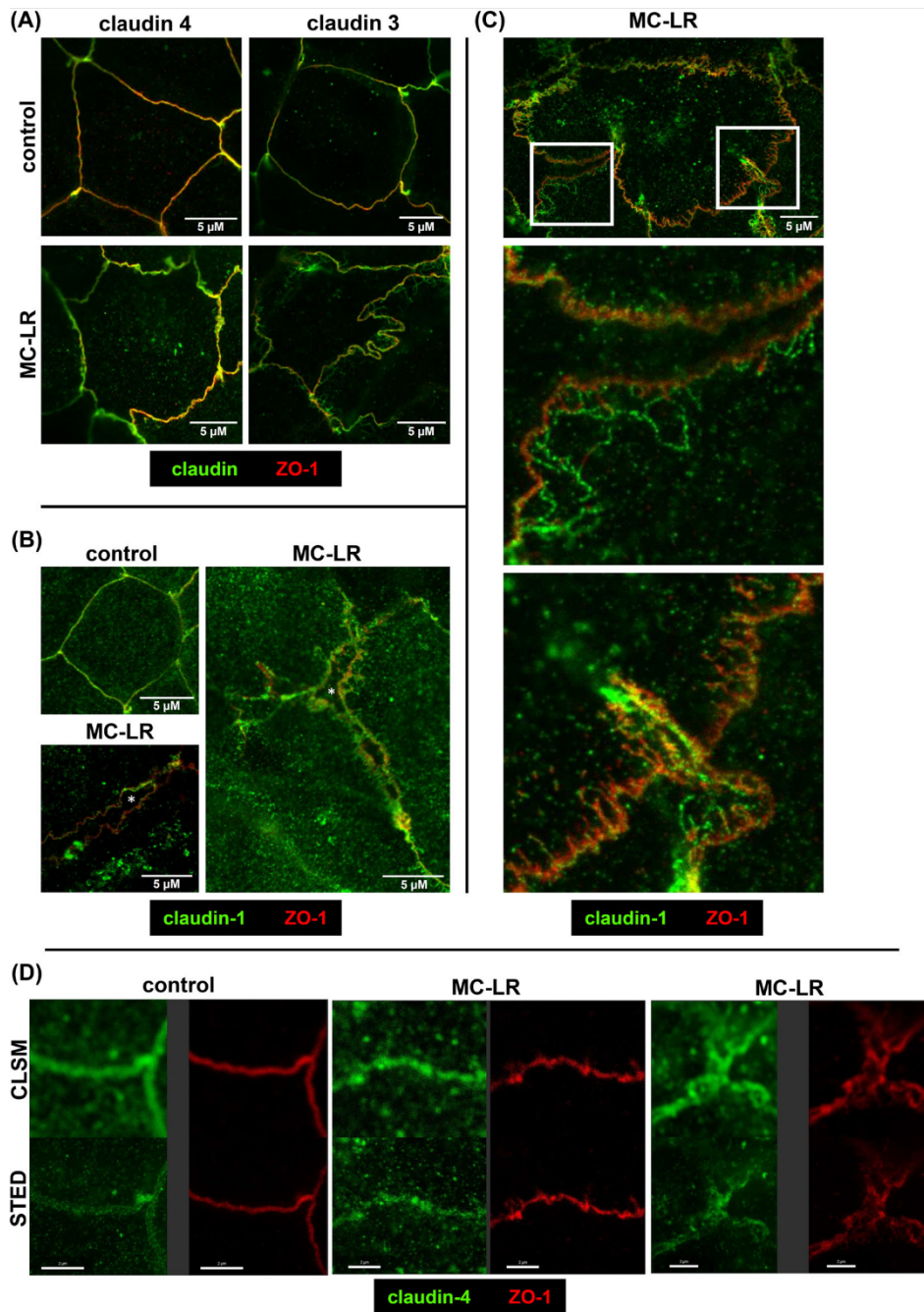
### Health risks

Rising water temperatures due to climate change exacerbate algal blooms. During these events, cyanobacteria (blue-green algae) produce phosphatase inhibitors, such as MC-LR, in response to high phosphate concentrations present and polluted water.<sup>10–12</sup> This may represent one mechanism by which water contamination by blue-green algae is harmful to humans, animals, and the aquatic life. Livestock animals (e.g., cattle) and pets (e.g., dogs) are especially at risk of poisoning from cyanotoxins.<sup>13</sup> Fatalities, especially in dogs, have been reported following cyanobacterial poisoning with microcystins,<sup>14</sup> and the microcystin LD<sub>50</sub> has been calculated to be  $\sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$  bodyweight.<sup>15</sup> Symptoms induced by sublethal cyanotoxin exposure include irritation of skin, eyes, nose, throat, and lungs, as well as neurological symptoms. Most relevant, however, may be the intestinal disease following the ingestion of cyanotoxins or contaminated water, which can lead to abdominal pain, vomiting, diarrhea, and liver damage.

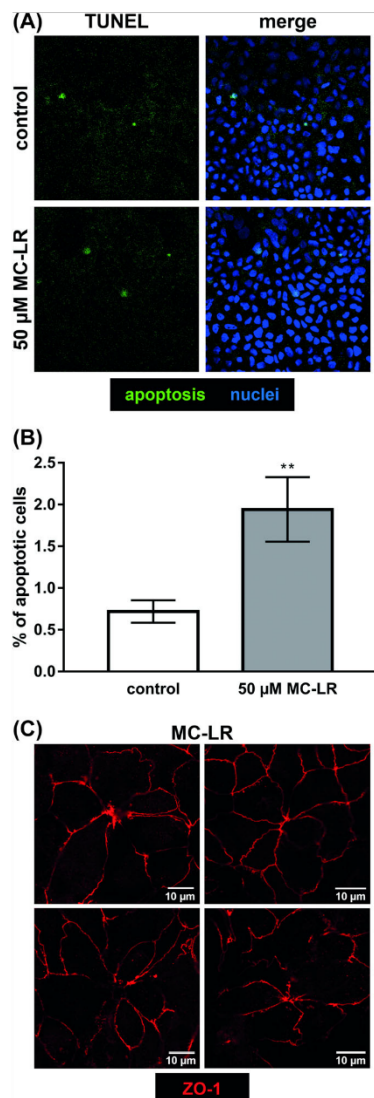
The intestinal pathology induced by ingested MC-LR begins with the disruption of epithelial integrity. This barrier loss as well as MC-LR uptake into the mucosa leads to subepithelial inflammatory responses. Finally, exposure of the liver via the portal circulation can result in severe hepatotoxicity. Here, we focused on the mechanisms of MC-LR-induced barrier loss. Our studies indicate that barrier loss occurs by at least two separate mechanisms reflecting cytoskeletally mediated increases in TJ leak pathway permeability and epithelial damage that results in unrestricted pathway permeability increases. The latter reflects, in part, cell death, but the mechanisms by which MC-LR induces cell death remain to be defined.

### Epithelial barrier dysfunction

We were able to show that barrier-forming claudins are affected, which could explain part of the barrier disruption in Caco-2 cell monolayers but is unlikely to explain increased flux across the leak pathway. Previous studies have characterized this barrier MC-LR-induced

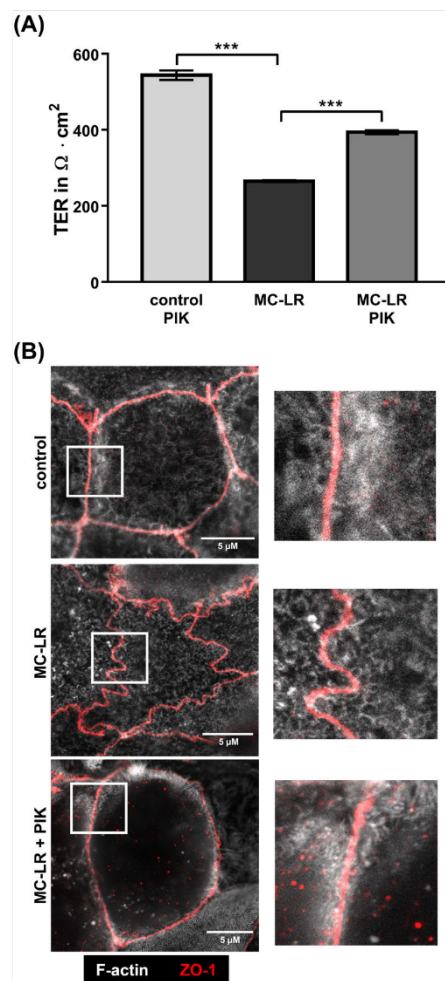


**FIGURE 3** Super-resolution analysis of Caco-2 monolayers via immunofluorescence staining and STED microscopy 24 h after microcystin treatment. Super-resolution STED microscopy was performed on small intestine-like Caco-2 monolayers treated with 50  $\mu$ M MC-LR for 24 h. Microscopic signals of zonula occludens protein-1 (ZO-1) are shown in red. Claudin-1, -3, and -4 were green colored. After MC-LR treatment, STED micrographs show (A) tight junction undulation and fraying in claudin-4 and claudin-3 staining or (B) split up of tight junctions at bicellular connections in claudin-1 staining. Asterisks indicate intercellular spaces (after retraction of lateral membranes). In the microscopic images, some cells appear larger after MC-LR treatment, as cell size increased by  $\sim$ 39% overall after counting cell numbers per overview. Bar = 5  $\mu$ m. (C) Digital zoom (white squares) on MC-LR-treated cells via STED microscopy reveals finer details (middle and lower images). (D) Comparative images of conventional confocal laser-scanning microscopy (CLSM) imaging and STED imaging. The changes in ZO-1 microscopic signals compared to controls (left) ranged from slight wave-shape phenotype (middle) to more intense fraying (right) of the TJ in MC-LR-treated monolayers. The claudin-4 staining additionally showed a weaker signal in the TJ domain, indicating a discontinuous TJ pattern or even a redistribution of claudin off the TJ. Bar = 2  $\mu$ m.



**FIGURE 4** Apoptosis induction by microcystin-LR. (A) Small intestine-like Caco-2 monolayers were treated with 50  $\mu\text{M}$  MC-LR. After 24 h, the rate of apoptotic cells was evaluated using TUNEL staining and LSM. TUNEL-positive cells are colored in green. Nuclei were stained with DAPI in blue. (B) Counting of apoptotic cells and all visible nuclei in a low-power field revealed the apoptotic ratio, each monolayer was counted in five random low-power fields;  $n = 3$ ,  $**p < 0.01$ , *t*-test with Welch's correction. (C) Four examples of restitutional rosette formation in MC-LR-treated cell monolayer. ZO-1 is colored red. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

barrier loss in terms of TER measurements and reduced the expression of occludin and ZO-1.<sup>16,17</sup> Specific claudins, however, have not been previously studied. Here, we focused on the main barrier-forming claudins expressed in Caco-2 cells. Claudin-1 protein expression was reduced, which could contribute to the functional barrier impairment. However, claudins were only rarely seen to be redistributed away from



**FIGURE 5** Recovery of epithelial barrier function and microstructural analysis of Caco-2 monolayers via TER measurement and immunofluorescence staining and STED microscopy after MC-LR treatment. (A) Inhibitor experiment. The specific MLCK inhibitor PIK had a significant effect in restoring barrier function 18 h after MC-LR treatment. All groups started with equal TER values, and the MC-LR group was different from untreated control with  $p < 0.001$ ;  $n = 4$ ,  $**p < 0.01$ , *t*-test with Welch's correction. (B) Microscopic findings. Cells showed more condensed F-actin (white) after 24 h of MC-LR treatment. ZO-1 is colored red and showed undulation of the TJ in the treated cell monolayers. Undulation of ZO-1 could be mitigated by the addition of 200  $\mu\text{M}$  D-reverse PIK (PIK), while the condensation of F-actin appears weaker. Depicted is one cell per condition in the left row (bar = 5  $\mu\text{m}$ ) and white squares with respective detail images (digital zoom) in the right row.

TJs. Membrane undulations and cell loss were far more prominent, suggesting that cytoskeletal TJ regulation and cytotoxicity were more significant mechanisms of MC-LR-induced barrier loss. Both of these mechanisms of barrier loss can lead to watery diarrhea by the leak flux mechanism.

## Protein phosphatase inhibition and changes of the cytoskeleton

This view on the phenomenon of TJ proteins being pulled out of the TJ domain of the enterocytes is quite mechanical, but it is in line with cell signaling regulation (e.g., MLCK pathway). Cortical actin (cortactin) also known as perijunctional actomyosin is highly regulated by phosphorylation and phosphatases. The interaction of cortical actin with the accessory TJ protein ZO-1 then leads, when constricted, to undulation of the membrane (due to actomyosin contraction) and finally to the retraction of claudins. In this way, the tension on ZO-1 and claudins led to the observed fraying and undulation of TJs, revealed by super-resolution microscopy. This is plausible for the action of MC-LR through phosphatase inhibition, which is followed by overphosphorylation of proteins in the cells and prevents MLC dephosphorylation. This allows unopposed activity of MLCK and hyperphosphorylation of MLC. In our STED micrographs of MC-LR-treated cells, the perijunctional F-actin shows up brighter than in control staining, reflecting a reticular condensation, which points to a constricted stage of the cytoskeleton causing the undulation of TJs. Previous work has shown that TJ membrane undulations (syn. ruffling) are a marker of increased MLCK phosphorylation.<sup>18</sup> Concomitantly to the TJ undulation, claudin-1 expression was decreased and the permeability for small macromolecules was increased,<sup>18</sup> similarly to our findings. We, therefore, hypothesized that, through its activity as a phosphatase inhibitor, MC-LR inhibited myosin phosphatase and allowed unopposed action of MLCK and increased MLC phosphorylation. To test this hypothesis, we used a specific MLCK inhibitor, DrPIK, and found that it was able to markedly attenuate MC-LR-induced barrier loss.

In contrast, the perijunctional cytoskeleton can also be affected by bacterial pore-forming toxins (PFTs), but via different signaling pathways. The PFTs integrate into the apical membrane of the host cell and form pores, conductive for, for example, potassium and calcium. In a previous study, aerolysin, a PFT from *Aeromonas hydrophila*, induced a calcium influx in intestinal HT-29/B6 epithelial cells followed by calcium signaling, which then led to actomyosin constriction via MLCK activation and resulted in a massive redistribution of TJ proteins.<sup>19</sup>

Beyond MLC, as an inhibitor of PP1 or PP2A phosphatases, MC-LR can affect phosphorylation-dependent signaling via protein kinase C and other transduction pathways. Moreover, MC-LR may, indirectly, allow increased phosphorylation of claudins, which has been reported to reduce barrier function by inhibiting protein kinase A and serine/threonine-specific protein kinase activated by GTP-bound RhoA (ROCK).<sup>20</sup> The failure of DrPIK to fully restore barrier function is consistent with the modest increase in TUNEL positivity following MC-LR treatment and suggests that cell death is a second pathologic mechanism. This may reflect MC-LR toxicity due to hyperactivation of phosphorylation-dependent processes. Accordingly, we demonstrated modest increases in cell death after MC-LR treatment. In principle, apoptosis induction is barrier-relevant.<sup>21</sup> However, the pan-caspase

inhibitor Q-VD-OPh was unable to limit barrier loss induced by MC-LR. Moreover, we observed rosette formation. This suggests that either apoptosis was not the primary mechanism of cell death or, alternatively, that, in this model, single cell apoptosis events were rapidly closed via purse-string contraction and had little effect on barrier function.<sup>22,23</sup> Nevertheless, both TUNEL and compensatory cell spreading, that is, restitution, indicate that MC-LR did induce cell loss.

Interestingly, previous work has suggested that barrier loss induced by okadaic acid, the toxin responsible for diarrhetic shellfish poisoning that inhibits PP1 and PP2A, is unaffected by MLCK inhibition with ML-9.<sup>24</sup>

Since the MLC is substrate of PP1, the phospho-status of the affected cells may be higher after the inhibition of PP1 by MC-LR.<sup>25</sup> PP1 and PP2A can interact with over 50 target proteins in the cell, regulating multiple cell functions, including actomyosin contraction or microtubule stability.<sup>26–28</sup> PP2A is the major phosphatase for microtubule-associated proteins (e.g., CDC2 and CDC25), as well as Raf, MEK, and Akt.<sup>29</sup>

Microtubule, intermediate filaments, and actin show morphological alterations within 20 min after MC-LR treatment (10–200  $\mu$ M) in hepatocytes and fibroblasts.<sup>30</sup> Thus, the opening of the leak pathway in our Caco-2 monolayers may mainly depend on the extent of the alterations in the actin cytoskeleton.

## CONCLUDING REMARKS

We have shown that even at low effective, MC-LR induces cytoskeletal TJ regulation. At higher concentrations, MC-LR leads to cell death.<sup>31</sup> MC-LR is released by *Microcystis* spp. when the bacterial membrane bursts. High local MC-LR concentrations can, therefore, follow ingestion of intact cyanobacteria in their rupture adjacent to the mucosal surface. However, the bacteria could be killed within the stomach, so that free MC-LR is released into larger volumes and toxin concentrations are lower. We, therefore, speculate that, in vivo, low MC-LR concentrations within the small intestine are responsible for TJ barrier loss, while higher concentrations are responsible for cell death. Concentration within the portal circulation may also lead to high-dose-induced hepatotoxicity.

In conclusion, MC-LR induces constriction of the perijunctional cytoskeleton in a small intestinal Caco-2 cell followed by the disruption of TJs, which leads to epithelial barrier dysfunction. This leak flux mechanism by opening the leak pathway can explain the watery diarrhea that occurs in humans following the ingestion of *Microcystis*-contaminated water.

## ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Claudia Heldt and Anja Fromm is gratefully acknowledged. The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant GRK 2318-2 C1 and DFG Schu 559/11-5 and by the National Institute of Health (NIH) grant R01 DK068271.

Thanks to D. Günzel and J. Piontek for the support and the grant for the STED microscope supported by the DFG.

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: J.L.K., R.B., J.D.S., and J.R.T. Acquisition of data: J.L.K., F.D.L.D.S., and R.B. Analysis and interpretation of data: J.L.K., R.B., and J.D.S. Drafting of the manuscript: J.L.K. and R.B. Revision of intellectual content of the manuscript: J.D.S., F.D.L.D.S., and J.R.T. Approval of the final version of the manuscript: J.L.K., F.D.L.D.S., R.B., J.D.S., and J.R.T.

#### COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

#### ORCID

Jerrold R. Turner  <https://orcid.org/0000-0003-0627-9455>

Roland Bückler  <https://orcid.org/0000-0002-1345-4146>

#### REFERENCES

- Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisaner, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Scientific World Journal*, 1, 76–113.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. O.-D., Chen, G.-C., Chen, G., & Yu, S.-Z. (1996). Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17, 1317–1321.
- Falconer, I. R., Buckley, T., & Runnegar, M. T. (1986). Biological half-life, organ distribution and excretion of 125-I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 39, 17–21.
- Pilotto, L. S., Douglas, R. M., Burch, M. D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G. J., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C. T., Hardiman, S., Moore, C., & Attewell, R. G. (1997). Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 21, 562–566.
- Fischer, W. J., Alzheimer, S., Cattori, V., Meier, P. J., Dietrich, D. R., & Hagenbuch, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 257–263.
- Mackintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., & Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, 264, 187–192.
- Haystead, T. A. J., Sim, A. T. R., Carling, D., Honnor, R. C., Tsukitani, Y., Cohen, P., & Hardie, D. G. (1989). Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, 337, 78–81.
- Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 268–287.
- Owens, S.-E., Graham, W. V., Siccardi, D., Turner, J. R., & Msrny, R. J. (2005). A strategy to identify stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase. *Pharmaceutical Research*, 22, 703–709.
- Paerl, H. (2008). Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619, 217–237.
- Holland, A., & Kinnear, S. (2013). Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide? *Marine Drugs*, 11, 2239–2258.
- Gobler, C. J. (2020). Climate change and harmful algal blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae*, 91, 101731.
- Beasley, V. R., Cook, W. O., Dahlem, A. M., Hooser, S. B., Lovell, R. A., & Valentine, W. M. (1989). Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 5, 345–361.
- Lurling, M., & Faassen, E. (2013). Dog poisonings associated with a *Microcystis aeruginosa* bloom in the Netherlands. *Toxins (Basel)*, 5, 556–567.
- Hunter, P. R. (1992). Cyanobacteria and human health. *Journal of Medical Microbiology*, 36, 301–302.
- Zhou, Y., Xu, X., Yu, B., & Yu, G. (2017). Characterization of in vitro effects of microcystin-LR on intestinal epithelial cells. *Environmental Toxicology*, 32, 1539–1547.
- Zhou, Y., Xue, M., Jiang, Y., Zhang, M., Wang, C., Wang, X., Yu, G., & Tang, Z. (2021). Beneficial effects of quercetin on microcystin-LR induced tight junction defects. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 733993.
- Shen, L., Black, E. D., Witkowski, E. D., Lencer, W. I., Guerriero, V., Schneeberger, E. E., & Turner, J. R. (2006). Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *Journal of Cell Science*, 119, 2095–2106.
- Bücker, R., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Fromm, A., Zeitz, M., Chakraborty, T., Fromm, M., Eppe, H.-J., & Schulzke, J.-D. (2011). Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* perturbs tight junction integrity and cell lesion repair in intestinal epithelial HT-29/B6 cells. *Journal of Infectious Diseases*, 204, 1283–1292.
- González-Mariscal, L., Garay, E., & Quirós, M. (2010). Chapter 6 - Regulation of claudins by posttranslational modifications and cell-signaling cascades. In A. S. L. Yu (Ed.), *Current topics in membranes* (Vol. 65, pp. 113–150). Academic Press.
- Butkevych, E., de Sa, F. D. L., Natramilarasu, P. K., Natramilarasu, P. K., & Bückler, R. (2020). Contribution of epithelial apoptosis and subepithelial immune responses in *Campylobacter jejuni*-induced barrier disruption. *Frontiers in Microbiology*, 11, 344.
- Florian, P., Schoneberg, T., Schulzke, J. D., Fromm, M., & Gitter, A. H. (2002). Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *Journal of Physiology*, 545, 485–499.
- Günzel, D., Florian, P., Richter, J. F., Troeger, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., & Gitter, A. H. (2006). Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290, R1496–R1507.
- Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P., & Hecht, G. (1997). The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology*, 112, 100–108.
- Ma, P., Foote, D. C., Sinnamon, A. J., & Brass, L. F. (2015). Dissociation of SHP-1 from spinophilin during platelet activation exposes an inhibitory binding site for protein phosphatase-1 (PP1). *PLoS One*, 10, e0119496.
- Cohen, P. T. W. (2002). Protein phosphatase 1-Targeted in many directions. *Journal of Cell Science*, 115, 241–256.
- Oliver, C. J., Terry-Lorenzo, R. T., Elliott, E., Bloomer, W. A. C., Li, S., Brautigan, D. L., Colbran, R. J., & Shenolikar, S. (2002). Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: The neurabin I/PP1

- complex regulates cell morphology. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 4690–4701.
28. Liao, H., Li, Y., Brautigan, D. L., & Gundersen, G. G. (1998). Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 21901–21908.
29. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., & Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 186–191.
30. Wickstrom, M. L., Khan, S. A., Haschek, W. M., Wyman, J. F., Eriksson, J. E., Schaeffer, D. J., & Beasley, V. R. (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic Pathology*, 23, 326–337.
31. Chen, L., & Xie, P. (2016). Mechanisms of microcystin-induced cytotoxicity and apoptosis. *Mini - Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 1018–1031.

**How to cite this article:** Kaak, J.-L., Lobo de Sá, F. D., Turner, J. R., Schulzke, J.-D., & Bücker, R. (2022). Unraveling the intestinal epithelial barrier in cyanotoxin microcystin-treated Caco-2 cell monolayers. *Ann NY Acad Sci.*, 1516, 188–196. <https://doi.org/10.1111/nyas.14870>



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Komplette Publikationsliste**

Kaak JL, Lobo de Sa FD, Turner JR, Schulzke JD, Bücker R. Unraveling the intestinal epithelial barrier in cyanotoxin microcystin-treated Caco-2 cell monolayers. *Ann N Y Acad Sci.* 2022, 1516(1), 188-196.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Roland Bücken für die ausgezeichnete Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Claudia Heldt und Dr. Fábila Daniela Lobo da Fonseca de Sá für die stetige Unterstützung und Hilfe bei der Zellkultur.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, Prof. Dr. Jerrold R. Turner und Anja Fromm, die meine Arbeit durch ihre Ideen und Vorschläge in zahlreichen Diskussionen unterstützt haben.

Für das wissenschaftliche Training möchte ich dem DFG Graduiertenkolleg 2318 meinen Dank ausdrücken.

Abschließend möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinischen Physiologie und den Doktorandinnen und Doktoranden für ihre unermüdliche Hilfe bei Labortätigkeiten und Fragen bedanken.