

DISSERTATION

Die Auswirkungen des binären *Clostridioides difficile* Toxins  
CDT auf die epitheliale Barriere

The Effects of Binary *Clostridioides difficile* Toxin CDT on the  
Epithelial Barrier

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lucas Heils

Erstbetreuung: PD Dr. rer. nat. Roland Felix Bückner

Datum der Promotion: 29. November 2024



## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	iv
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung .....	4
1.1 <i>Clostridioides difficile</i> .....	4
1.2 Virulenzfaktoren von <i>Clostridioides difficile</i> .....	4
1.3 Charakterisierung der Hypervirulenz von CDT-produzierenden <i>C. difficile</i> - Stämmen .....	5
1.4 Die epitheliale Barriere als potenzielle Zielstruktur der Toxinwirkung – Einführung in Struktur und Funktion der Tight Junctions.....	6
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	6
2 Methodik .....	8
2.1 Das Zellkulturmodell HT-29/B6-GR/MR.....	8
2.2 Behandlung der Zellen mit dem binären <i>C. difficile</i> -Toxin CDT.....	8
2.3 Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barrierefunktion .....	9
2.4 Untersuchung der Zytotoxizität .....	9
2.5 Untersuchung der Apoptose-Induktion .....	10
2.6 Western Blot-Analyse der Proteinexpression .....	10
2.7 Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie .....	11
2.8 Inhibitionsversuche .....	12
2.9 Statistische Analyse.....	12
3 Ergebnisse .....	13
3.1 Die Wirkung von CDT auf die epitheliale Barriere .....	13
3.2 Untersuchung der Induktion von Nekrose und Apoptose durch CDT.....	14
3.3 Expression von Tight Junction-Proteinen nach Behandlung mit CDT .....	16
3.4 Mikrostrukturelle Analyse der Tight Junction nach Behandlung mit CDT .....	17

---

3.5	Effekte von CDT auf die trizelluläre Tight Junction .....	19
3.6	Disinhibition der CDT-induzierten Barrierestörung durch PIK, den Inhibitor der Myosin-leichte-Ketten-Kinase .....	21
3.7	Abhängigkeit der CDT-induzierten Barrierestörung vom Lipolyse-stimulierten Lipoprotein-Rezeptor LSR .....	23
4	Diskussion.....	25
4.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse .....	25
4.2	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand .....	29
4.3	Stärken und Schwächen der Studie .....	31
4.3.1	Stärken der Studie .....	31
4.3.2	Interne Validität .....	32
4.3.3	Externe Validität.....	33
4.4	Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung .....	34
5	Schlussfolgerungen .....	36
	Literaturverzeichnis .....	37
	Eidesstattliche Versicherung .....	43
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen .....	44
	Auszug aus der Journal Summary List .....	45
	Druckexemplar der Publikation .....	47
	Lebenslauf.....	62
	Komplette Publikationsliste .....	63
	Danksagung .....	64



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barriere nach Behandlung mit CDT .....	13
Abbildung 2: Barrierefunktion und Zytotoxizität.....	15
Abbildung 3: Barrierefunktion und Apoptoserate .....	16
Abbildung 4: Western Blot-Analyse der Expression verschiedener TJ-Proteine .....	17
Abbildung 5: Hochauflösende STED-Mikroskopie mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und F-Aktin.....	18
Abbildung 6: Hochauflösende STED-Mikroskopie mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und Claudin-4.....	19
Abbildung 7: Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) und hochauflösende STED-Mikroskopie mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und Trizellulin .....	20
Abbildung 8: Hochauflösende STED-Mikroskopie mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und Occludin .....	21
Abbildung 9: Ausbleiben des Defektes der epithelialen Barriere durch den spezifischen MLCK-Inhibitor PIK .....	22
Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisation von Claudin-4 nach apikaler Behandlung mit CDT und protektiver Zugabe von PIK. ....	23
Abbildung 11: Epitheliale Barrierefunktion in Abhängigkeit des Vorhandenseins des CDT-Rezeptors LSR.....	24

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Form
bTJ	Bizelluläre Tight Junction
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CAM	Calmodulin-Kinase
CAMK	Calmodulin-Kinase-Motive
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> -Infektion
CLSM	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie
F-Aktin	Filamentäres Aktin
G-Aktin	Monomeres Aktin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LSR	Lipolyse-stimulierter Lipoprotein-Rezeptor
MLCK	Myosin-leicht-Ketten Kinase
MR	Mineralokortikoidrezeptor
PIK	D-reverse PIK
RT	Ribotyp
STED	Stimulated-Emission-Depletion
TER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight Junction
tTJ	Trizelluläre Tight Junction
TUNEL	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase dUTP nick end labeling
ZO-1	Zonula occludens-Protein 1

## Zusammenfassung

Einleitung: *Clostridioides difficile* ist die häufigste Ursache antibiotikaassoziierter Diarrhöen. Hypervirulente *C. difficile*-Stämme produzieren zusätzlich zu den Toxinen TcdA und TcdB das binäre Toxin CDT. Eine Infektion mit diesen CDT-produzierenden Stämmen ist mit einem erhöhten Risiko für einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf assoziiert. Die epitheliale Barriere wird durch Tight-Junction-Proteine ausgebildet und ist häufig Zielstruktur bakterieller Toxine. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere.

Methode: HT-29/B6-GR/MR-Monolayer wurden mit subtoxischen Konzentrationen von CDT behandelt. Eine funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barriere erfolgte durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) und der Permeabilität für die Makromoleküle Fluorescein (332 Da) und FITC-Dextran (4 kDa). Eine mögliche Induktion von Nekrosen wurde mit einem LDH-Release-Assay und eine mögliche Apoptoseinduktion mit einem TUNEL-Assay analysiert. Die Proteinexpression verschiedener Tight Junction (TJ)-Proteine wurde mittels Western Blot untersucht. Eine Analyse der Lokalisation und Zusammensetzung verschiedener TJ-Proteine erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und hochauflösender STED-Mikroskopie.

Ergebnisse: Subtoxische Konzentrationen des *C. difficile*-Toxins CDT bewirkten eine funktionelle Störung der epithelialen Barriere mit reduziertem TER und erhöhter Permeabilität für die Makromoleküle Fluorescein und FITC-Dextran. In den verwendeten Konzentrationen war keine relevante Induktion von Nekrose und Apoptose und keine veränderte Expression der untersuchten TJ-Proteine nachzuweisen. Molekulares Korrelat für die Barrierestörung hingegen war eine subzelluläre Umverteilung der TJ-Proteine Trizellulin, Occludin und Claudin-4 und eine perijunktionale Kondensation des Aktin-Zytoskeletts. Die Effekte des CDT auf die epitheliale Barriere konnten durch Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Kinase MLCK verhindert werden.

Diskussion: Subtoxische Konzentrationen des CDT beeinträchtigen die funktionelle Integrität der epithelialen Barriere durch eine MLCK-vermittelte gestörte Lokalisation von barrierebildenden TJ-Proteinen. Ein veränderter Phosphorylierungsstatus und ein Calciumeinstrom stellen mögliche Ursachen für eine CDT-vermittelte Aktivierung der MLCK dar. Diese Barrierestörung, insbesondere die Öffnung des parazellulären Durchtrittsweges für Makromoleküle, ist ein Erklärungsansatz für die Hypervirulenz von

CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämmen. Als weitere mögliche Ursachen der Hypervirulenz werden die CDT-vermittelte Zytotoxizität, eine veränderte Expression der Toxine TcdA und TcdB, die Wirkung des CDTb als porenformendes Toxin, ein Durchtritt von luminalen Antigenen im Sinne des Leaky-Gut-Konzeptes ein erleichterter Rezeptorzugang für die Toxine TcdA und TcdB diskutiert.

## **Abstract**

Introduction: *Clostridioides difficile* is the most common cause of antibiotic-associated diarrhea. Hypervirulent *C. difficile* strains produce, in addition to toxins TcdA and TcdB, the binary toxin CDT. An infection with these CDT-producing strains is associated with an increased risk of a severe disease course. The epithelial barrier is formed by tight junction proteins and is often the target structure of bacterial toxins. Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of CDT on the epithelial barrier.

Methods: HT-29/B6-GR/MR monolayers were treated with subtoxic concentrations of CDT. Functional characterization of the epithelial barrier was performed by measuring transepithelial electrical resistance (TER) and the permeability to the macromolecules fluorescein (332 Da) and FITC-dextran (4 kDa). Potential induction of necrosis was analyzed using an LDH release assay. Potential apoptosis induction was assessed using TUNEL assay. The expression level of various tight junction (TJ) proteins was examined by Western blotting. Analysis of the subcellular localization of different TJ proteins was performed using confocal laser-scanning microscopy and high-resolution STED microscopy.

Results: Subtoxic concentrations of the *C. difficile* toxin CDT resulted in a functional disruption of the epithelial barrier, characterized by reduced TER and increased permeability to macromolecules such as fluorescein and FITC-Dextran. At the concentrations used, there was no relevant induction of necrosis and apoptosis, and no altered expression of the examined TJ proteins could be detected. The molecular correlate for the barrier disruption, however, was a subcellular redistribution of the TJ proteins tricellulin, occludin and claudin-4, as well as perijunctional condensation of the actin cytoskeleton. The effects of CDT on the epithelial barrier could be prevented by inhibiting the Myosin Light-Chain Kinase (MLCK).

Discussion: Subtoxic concentrations of CDT impaired the functional integrity of the epithelial barrier through MLCK-mediated de-localization of barrier-forming TJ proteins. An altered phosphorylation status and calcium influx are potential causes for CDT-mediated MLCK activation. This barrier disruption, particularly the opening of the paracellular passage for macromolecules, provides an explanation for the hypervirulence of CDT-producing *C. difficile* strains. Other potential causes of hypervirulence discussed include CDT-mediated cytotoxicity, altered expression of the toxins TcdA and TcdB, the poreforming effect of CDTb, the passage of luminal antigens in line with the Leaky Gut concept, and facilitated receptor access for the toxins TcdA and TcdB.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Clostridioides difficile*

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) ist ein grampositives, obligat anaerobes und Sporen bildendes Bakterium, welches die häufigste Ursache nosokomialer Infektionen des Gastrointestinaltraktes und antibiotika-assoziiertes Diarrhöen ist (Abt et al., 2016; Magill et al., 2014). Beschriebene Risikofaktoren für eine Infektion mit *C. difficile* sind die Einnahme von Antibiotika, der Aufenthalt in einer Klinik oder in einer Pflegeeinrichtung, eine Immunsuppression und ein Alter über 65 Jahre (Guery et al., 2019). Die Symptome einer Infektion mit *C. difficile* reichen von einer leichten Diarrhö bis hin zur Entwicklung einer pseudomembranösen Colitis oder eines toxischen Megakolons (Guery et al., 2019). Die Letalität innerhalb eines Monats nach *C. difficile*-Infektion (CDI) beträgt 15-20%, wobei die Hälfte der Todesfälle direkt auf die Infektion mit *C. difficile* zurückzuführen sind (Planche et al., 2013).

Die Systematisierung von *C. difficile* in PCR-Ribotypen ist die gängigste Methode zur Klassifizierung und Identifizierung verschiedener Stämme dieses Bakteriums. Die unterschiedlichen Ribotypen weisen eine starke genetische Heterogenität auf, welche sich unter anderem in einer unterschiedlichen Pathogenität äußert (Guery et al., 2019).

## 1.2 Virulenzfaktoren von *Clostridioides difficile*

Mit Ausnahme weniger nicht pathogener Stämme wie dem Ribotyp RT010, produziert *C. difficile* als Virulenzfaktoren die großen glykosylierenden Toxine TcdA und TcdB (Aktories et al., 2017). Nach Rezeptorbindung, Endozytose und Freisetzung ins Zytosol weisen TcdA und TcdB eine enzymatische Aktivität als UDP-Glukose-Transferase auf, welche durch die Bindung von Glukose verschiedene Rho-GTPasen wie RHO, RAC1 und CDC24 inaktiviert (Aktories et al., 2017). Als Auswirkungen der Inaktivierung dieser zentralen Regulatoren von Genexpression, Zellzyklus und Zytoskelett sind unter anderem zytotoxische Effekt, eine gestörte epitheliale Barrierefunktion, die Induktion von Apoptosen und die Aktivierung des Inflammasoms beschrieben (Kordus et al., 2022). Neben diesen großen, glykosylierenden Toxinen produzieren hypervirulente *C. difficile*-Stämme, wie der Ribotyp RT027, zusätzlich das binäre Toxin CDT (Young et al., 2022).

### 1.3 Charakterisierung der Hypervirulenz von CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämmen

Eine Infektion mit einem Ribotypen wie dem RT027, welcher das binäre Toxin CDT produziert, ist mit einem gesteigerten Risiko für einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf, Komplikationen und wiederkehrende Infektionen sowie einer höheren Mortalität assoziiert (López-Cárdenas et al., 2021; Young et al., 2022). Epidemiologische Daten für Deutschland zeigen eine regional unterschiedliche, zum Teil sehr hohe Prävalenz hypervirulenter Stämme in Infektionen mit *C. difficile*. So wurde beispielsweise zwischen 2014 und 2019 in Deutschland bei 36% der klinischen Isolate der hypervirulente Ribotyp 027 nachgewiesen (Abdrabou et al., 2021). Die epidemiologischen Daten der CDI zeigen eine hohe klinische Relevanz hypervirulenter Stämme und eine Zunahme ihrer Prävalenz in Deutschland und auch global (Abdrabou et al., 2021; Guery et al., 2019; Marujo & Arvand, 2020).

Die hypervirulenten *C. difficile*-Stämme zeichnen sich durch die Produktion des binären Toxins CDT aus. Dieses besteht aus den zwei Untereinheiten CDTa und CDTb (Aktories et al., 2017). Nach der Bindung des Lipolyse-stimulierten Lipoprotein-Rezeptors (LSR) durch die Untereinheit CDTb wird der Toxinkomplex, bestehend aus CDTa und CDTb endozytiert (Hemmasi et al., 2015). In die Zelle internalisiertes CDTa bewirkt eine ADP-Ribosylierung von monomerem Aktin (G-Aktin). Hierdurch wird die Polymerisierung zu filamentärem Aktin (F-Aktin) inhibiert (Gülke et al., 2001). Bisher beschriebene Effekte des binären Toxins sind eine Abrundung der Zellen, eine reduzierte Zellviabilität und eine Umstrukturierung von Microtubuli (Martínez-Meléndez et al., 2022). Neben diesen durch den Verlust eines intakten Aktin-Zytoskeletts bewirkten Auswirkungen von CDT ist eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus des Proteoms beschrieben. So bewirkt CDTa beispielsweise eine gesteigerte Phosphorylierung von Calmodulin-Kinase Motiven (CAM) (Stieglitz et al., 2021), welche unter anderem die Aktivität der Myosin-leicht-Ketten-Kinase (MLCK) regulieren (Jin & Blikslager, 2020).

Die zellulären Effekte des CDT werden insbesondere auf den Zusammenbruch des Zytoskeletts und die damit verbundene Zytotoxizität zurückgeführt. Bisher ist jedoch unklar, welche zelluläre Auswirkungen dieses Toxin in niedrigen, vorwiegend nicht zytotoxischen Konzentrationen hat.

## 1.4 Die epitheliale Barriere als potenzielle Zielstruktur der Toxinwirkung – Einführung in Struktur und Funktion der Tight Junctions

Epithelien sind ein- oder mehrschichtige Zellverbände, welche die inneren und äußeren Oberflächen von Organismen auskleiden und eine Barriere zur Umgebung ausbilden. Ein elementarer Bestandteil dieser epithelialen Barriere sind die Tight Junctions (TJ), welche die apikal gelegenen interzellulären Verbindungen darstellen. Die humanen intestinalen TJ bestehen aus Claudinen, Zonula occludens-Protein 1 (ZO-1), Occludin, Trizellulin und weiteren akzessorischen Proteinen wie JAM-A oder LSR. Diese Proteine des TJ-Komplexes bilden die epitheliale Barriere, halten eine epitheliale Polarität aufrecht und regulieren die Permeabilität des Darmepithels (Krug et al., 2014).

Die TJ-Proteine unterliegen einer komplexen Regulation, welche unter anderem durch das Aktin-Zytoskelett vermittelt wird. Dieses stabilisiert beispielsweise den TJ-Komplex über eine direkte Interaktion mit verschiedenen Proteinen wie ZO-1. Auch der dynamische Auf- und Abbau der TJ wird durch das perijunktional lokalisierte Aktin-Myosin-Netzwerk reguliert. So führt eine Kontraktion des Myosins, welche durch die Aktivität der MLCK induziert wird, zu einem Heraussortieren von TJ-Proteinen aus dem TJ-Komplex (Jin & Blikslager, 2020).

Die epitheliale Barriere ist eine häufige direkte oder indirekte Zielstruktur für die Wirkung bakterieller Toxine. Beispiele hierfür sind das *Aeromonas hydrophila*-Toxin AerA (Bücker et al., 2011), das B2 *Escherichia coli*-Toxin HlyA (Schulz et al., 2021) und die *C. difficile*-Toxine TcdA und TcdB. Für letztere ist beispielsweise die Dissoziation von Occludin aus der TJ beschrieben (Nusrat et al., 2001). Zudem erfolgt die Regulation der TJ unter anderem vermittelt durch das Aktin-Zytoskelett, welches direkter Effektor des CDT ist (Gülke et al., 2001). Daher liegt ein Effekt von CDT auf die epitheliale Barriere nahe. Ein Verlust der epithelialen Barrierefunktion kann über eine gesteigerte Permeabilität für Ionen und Makromoleküle eine klinische Durchfallsymptomatik bewirken. Außerdem kann eine gestörte epitheliale Barriere durch eine erhöhte Durchlässigkeit für luminale Antigene im Sinne des Leaky-Gut-Phänomens eine Immunreaktion induzieren, welche wiederum die epitheliale Barriere schädigen kann (Krug et al., 2014).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Da die Wirkung und der Anteil des binären *C. difficile*-Toxins CDT bei der Infektion mit hypervirulenten *C. difficile*-Stämmen nicht hinreichend bekannt ist, war es Ziel der



vorliegenden Arbeit, eine mögliche Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere zu identifizieren und zu charakterisieren. Insbesondere sollte die zelluläre Wirkung geringer, subtoxischer Konzentrationen des CDT untersucht werden. Diese wurden verwendet, um die Toxinwirkung in der humanen Pathologie simulieren, da *C. difficile*-Bakterien nicht invasiv in die Mukosa eindringen und die Toxine im Darmlumen freigesetzt und verdünnt werden. Hierdurch sollte ein Beitrag zum Verständnis der CDT-assoziierten Hypervirulenz geleistet werden, um PatientInnen mit schweren Verläufen einer CDI in Zukunft besser versorgen zu können.

## 2 Methodik

### 2.1 Das Zellkulturmodell HT-29/B6-GR/MR

Als Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente diente ein HT-29/B6-GR/MR-Zellkulturmodell. Bei diesen Zellen handelt es sich um immortalisierte Kolonkarzinomzellen, welche unter Kulturbedingungen konfluente Monolayer ausbilden. Dieser Subklon der HT-29/B6-Zelllinie ist im Institut für klinische Physiologie, Charité, Berlin generiert worden und weist zusätzlich stabile Expression des  $\alpha$ -Glukokortikoidrezeptors (GR) und des Mineralokortikoidrezeptors (MR) auf (Bergann et al., 2011; Heils et al., 2023).

HT-29/B6-GR/MR-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in Roswell-Park-Memorial-Institute-Zellkulturmedium (RPMI 1640; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), supplementiert mit GlutaMAX (Gibco) für 7 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Das Medium wurde zusätzlich mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), 300 µg/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA) und 200 µg/ml Hygromycin B (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) ergänzt (Heils et al., 2023).

Für die Durchführung der Experimente wurden die Zellen in Polycarbonat-Filtereinsätzen kultiviert (Millicell-PCF, effektive Membranfläche 0.6 cm<sup>2</sup>, Porengröße 3 µm, Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Deutschland). Sämtliche Versuche wurden nach Erreichen eines konfluenten Wachstums der Zellen durchgeführt. Dies trat nach acht bis neun Tagen ein (Heils et al., 2023).

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Wirkung des CDT vom Vorhandensein des LSR wurden HT-29/B6-Zellen mit einem stabilen LSR-Knockout verwendet. Diese wurden mit einem sgRNA-CRISPR/Cas9-Vektor durch Ayala-Torres *et al.*, 2021 generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Ayala-torres et al., 2021). Diese Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1,5 µg/ml Puromycin kultiviert und ansonsten analog zu den HT-29/B6-Zellen für die Experimente vorbereitet (Heils et al., 2023).

### 2.2 Behandlung der Zellen mit dem binären *C. difficile*-Toxin CDT

Die *C. difficile*-Toxine CDTa und CDTb wurden durch ein *Escherichia coli*-Expressionssystem am Institut für Toxikologie, Medizinischen Hochschule Hannover,

Deutschland synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Beer et al., 2018). Konfluente HT29/B6-Monolayer wurden mit CDTa in einer Konzentration von 5 ng/ml und CDTb in einer Konzentration von 10 ng/ml für 24 Stunden inkubiert. Die Zugabe der Toxine erfolgte in das apikale Kompartiment (Heils et al., 2023).

### 2.3 Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barrierefunktion

Um die Integrität der epithelialen Barriere zu untersuchen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) mit einem Widerstandsmessgerät und Chopstick-Elektroden (EVOM<sup>3</sup>; World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) unter sterilen Bedingungen gemessen. Der Messwert des TER wurde um den Leerwiderstand des Polycarbonat-Filtereinsatzes korrigiert und auf die Oberfläche des Zellmonolayers von 0,6 cm<sup>2</sup> bezogen (Heils et al., 2023).

Zur Untersuchung der epithelialen Permeabilität für makromolekulare Marker erfolgte die apikale Zugabe von 100 µM Fluorescein (332 Da) beziehungsweise 200 µM FITC-Dextran (4 kDa) 24 Stunden nach Behandlung mit CDT. Anschließend wurden Proben aus dem basolateralen Kompartiment entnommen (Fluorescein: alle 15 Minuten, FITC-Dextran: alle 30 Minuten). Die Konzentration der fluoreszierenden Marker in den entnommenen Proben wurde spektralphotometrisch ermittelt (Tecan GmbH, Maennedorf, Switzerland) und die Permeabilität als Flux geteilt durch den Konzentrationsunterschied pro Zeiteinheit berechnet (Heils et al., 2023).

### 2.4 Untersuchung der Zytotoxizität

Eine mögliche Induktion von Nekrose durch das *C. difficile*-Toxin CDT wurde mittels CyQUANT LDH Zytotoxizitäts-Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA., USA) nach Protokoll des Herstellers untersucht. Die Messung der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung, welche mit der Induktion von Nekrosen korreliert, erfolgte durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion, bei welcher LDH indirekt über NAD-Reduktion die Umwandlung eines Tertrazoliumsalzes zu einem Formazanprodukt katalysiert, welches spektralphotometrisch (Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz) bestimmt wurde (Heils et al., 2023).

Die maximale LDH-Aktivität wurde durch Lyse von Kontrollzellen ermittelt. Als Positivkontrolle für die Induktion von Nekrosen wurden HT-29/B6-GR/MR-Monolayer mit Interferon-γ für 72 Stunden behandelt. Die Zugabe von 500 U/ml und 1000 U/ml erfolgte

in das basolaterale Kompartiment. Die Zytotoxizität wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\% \text{ Zytotoxizität} = \left( \frac{\text{LDH Aktivität nach Behandlung mit Testsubstanz} - \text{spontane LDH Aktivität}}{\text{maximale LDH Aktivität} - \text{spontane LDH Aktivität}} \right) \times 100$$

## 2.5 Untersuchung der Apoptose-Induktion

Eine mögliche Apoptose-Induktion durch CDT wurde mit einem terminalen Deoxynucleotidyltransferase-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Assay untersucht (In situ Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Deutschland). 24 Stunden nach Behandlung mit CDT wurden die Zellen in 2% Paraformaldehyd (Electron Microscopy Science, Hatfield, PE, USA) fixiert und der TUNEL-Assay nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mit diesem Assay wird durch Apoptose fragmentierte DNA enzymatisch fluoreszenzmarkiert. Zellkerne wurden mit DAPI (1:1000; Roche) angefärbt. Die Visualisierung und Zählung apoptotischer Zellen erfolgte durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM; Zeiss LSM780, Jena, Deutschland). Als Positivkontrolle dienten HT-29/B6-GR/MR-Zellen, welche für 24 Stunden mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin (1  $\mu\text{M}$ ; Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) behandelt wurden (Heils et al., 2023).

## 2.6 Western Blot-Analyse der Proteinexpression

Die quantitative Proteinexpression barrierebildender TJ-Proteine wurde mittels Western Blots analysiert. Hierzu wurden zu den HT-29/B6-GR/MR-Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ein Lysepuffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Puffer (pH 7.5), 0,5% Triton X-100, 1% SDS und Complete Protease Inhibitor (Roche) hinzugegeben und die Zellen mechanisch von den PCF-Filtern gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 13.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die in den Überständen enthaltene Proteinkonzentration wurde mit einem Pierce BCA-Assay (Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers bestimmt (Heils et al., 2023).

Proteinproben (20  $\mu\text{g}$ ) wurden in einem SDS-Gel (12,5%) elektrophoretisch nach dem molekularen Gewicht aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde mit 1% PVP-40

(Polyvinylpyrrolidon; Sigma Aldrich) in einem TBST-Puffer mit 0,05% Tween-20 bei Raumtemperatur blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer wurde einer der folgenden Primärantikörper zu den Membranen hinzugegeben: Claudin-1 (1:1000; Invitrogen), Claudin-3 (1:1000; Invitrogen), Claudin-4 (1:1000; Invitrogen), Claudin-5 (1:1000; Invitrogen), Trizellulin (1:2000; Invitrogen), Occludin (1:1000; Proteintech Rosemont, Illinois, USA) und anti-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle (1:10000; Sigma Aldrich). Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreifachem Waschen mit TBST-Puffer wurden die Membranen mit einem Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch, Ely, Großbritannien) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinbanden wurden nach Zugabe von SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide Solution (Thermo Scientific) mit dem Fusion FX Chemilumineszenz-Imager (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) detektiert. Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mit der Software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Heils et al., 2023).

## 2.7 Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie

Die Lokalisation verschiedener Tight Junction-Proteine wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) oder hochauflösende Stimulated Emission Depletion-Mikroskopie (STED) untersucht. PCF-Filter mit einem adhärenen HT-29/B6-GR/MR-Monolayer wurden für 20 Minuten in 2% Paraformaldehyd (Electron Microscopy Science, Hatfield, PE, USA) fixiert. Nach mehrfachem Waschen der Zellen in PBS (Gibco) erfolgte eine Inkubation mit folgenden Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C: Claudin-4 (1:100; Invitrogen), Occludin (1:100; Invitrogen), Trizellulin (1:400; Invitrogen) und ZO-1 (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) (Heils et al., 2023).

Nach wiederholtem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Inkubation der Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) und Alexa Fluor 594 (1:500; Invitrogen) für die CLSM-Untersuchungen beziehungsweise Abberior STAR RED and Abberior STAR ORANGE (1:200; Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland) für die STED-Untersuchungen. In einem Teil der Versuche erfolgte zeitgleich mit der Sekundärantikörper-Zugabe die Färbung des filamentären Aktins (F-Aktin) mit Phalloidin DY-647P1 (1:500; Dyomics GmbH, Jena, Deutschland). Für die CLSM wurden die Zellkerne mit DAPI (1:1000; Roche) gefärbt.

Anschließend wurden die PCF-Filter zweimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und auf einem Objektträger mit ProTaq Mount Fluor (Biocyc, Luckenwalde, Deutschland) oder STED-kompatiblen Eindeckmedium (Abberior GmbH) fixiert (Heils et al., 2023).

Die Visualisierung der Lokalisation der TJ-Proteine erfolgte mit CLSM (Zeiss LSM780, Jena, Germany) und STED-Mikroskopie (Abberior Facility Line, Abberior GmbH) (Heils et al., 2023).

## **2.8 Inhibitionsversuche**

Für die Inhibitionsversuche der Apoptose wurde eine Stunde vor der Toxinbehandlung der Pancaspase-Inhibitor Q-VD-OPh-Hydrat (10  $\mu$ M; Calbiochem, San Diego, Californien, USA) in das basolaterale Kompartiment zugegeben.

Die Untersuchung der Inhibition der Myosin-leicht-ketten-Kinase (MLCK) erfolgte durch die apikale Zugabe des spezifischen Pseudosubstrates der MLCK D-reverse PIK (PIK, 200  $\mu$ M; Laboratory for mucosal barrier pathology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) 30 Minuten vor der Toxinbehandlung (Owens et al., 2005; Heils et al., 2023).

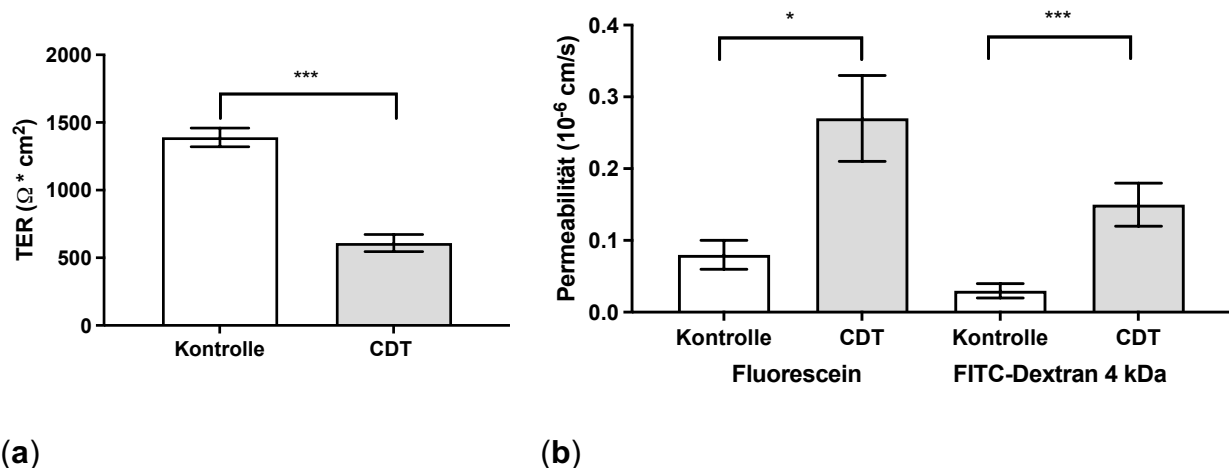
## **2.9 Statistische Analyse**

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte unter Nutzung des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software Version 7, San Diego, CA, USA). Nach Prüfung der Voraussetzungen für die statistischen Testungen wurden p-Werte mittels t-Test oder ANOVA berechnet. Im Falle von multiplem Testen wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet (Heils et al., 2023).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Wirkung von CDT auf die epitheliale Barriere

Um die Wirkung des binären *C. difficile*-Toxins CDT auf die epitheliale Barriere des Darmes zu untersuchen, wurden HT-29/B6-GR/MR-Monolayer mit 5 ng/ml CDTa und 10 ng/ml behandelt. 24 Stunden nach apikaler Zugabe des binären Toxins war der TER im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um die Hälfte reduziert (Abbildung 1a). Zudem zeigte sich eine um den Faktor 3 erhöhte parazelluläre Permeabilität für den makromolekularen Marker Fluorescein (332 Da) und eine um den Faktor 5,5 erhöhte Permeabilität für Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran 4 kDa (Abbildung 1b) (Heils et al., 2023).



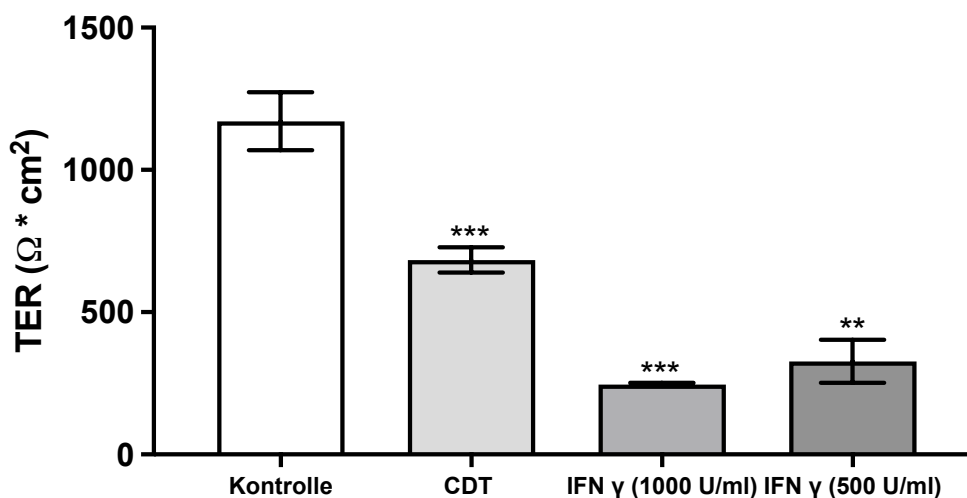
**Abbildung 1:** Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barrierefunktion von HT-29/B6-GR/MR Monolayern 24 Stunden nach Behandlung mit dem binären *C. difficile*-Toxin CDT. (a) Messung des TER und (b) der Fluxes der makromolekularen parazellulären Marker Fluorescein (332 Da) und FITC-Dextran (4 kDa). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , t-Test,  $n = 5$ . (Abbildung modifiziert nach Heils et al. 2023 (Heils et al., 2023)).

Nach 24-stündiger Behandlung von HT-29/B6-GR/MR-Zellen mit den einzelnen Untereinheiten CDTa in einer Konzentration von 5 ng/ml beziehungsweise CDTb in einer Konzentration von 10 ng/ml zeigte sich ein im Vergleich zur Kontrolle unveränderter TER (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von CDTb in einer Konzentration von 3000 ng/ml verminderte den TER auf  $41 \pm 9\%$  des initialen Wertes nach 24 Stunden ( $p < 0.01$ , t-Test,

n = 4). Die apikale Zugabe von CDTa hatte auch bei einer Konzentration von 3000 ng/ml keinen Effekt auf den TER ( $102 \pm 2\%$  des initialen TER 24 Stunden nach 24, n.s., t-Test, n = 3) (Heils et al., 2023).

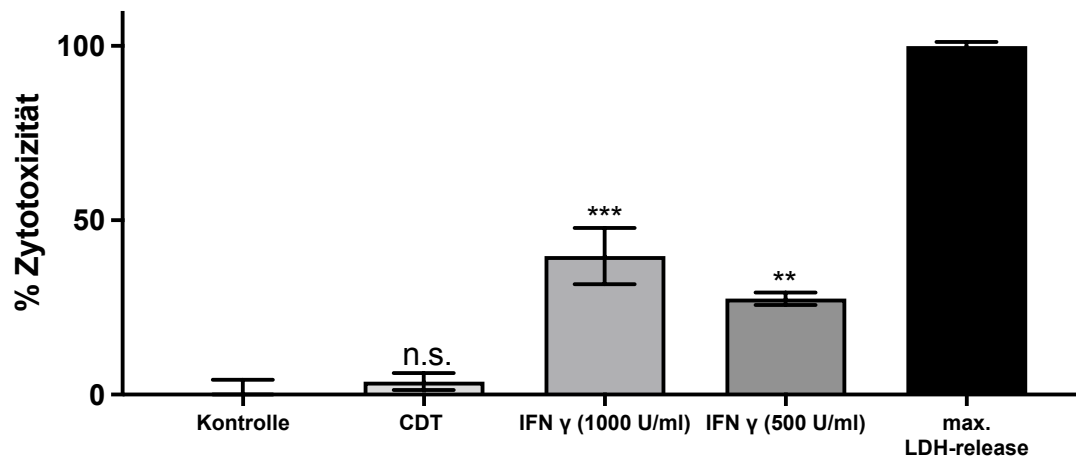
### 3.2 Untersuchung der Induktion von Nekrose und Apoptose durch CDT

Der Beitrag zytotoxischer Effekte zur Störung der epithelialen Barrierefunktion wurde zunächst mit einem LDH-Release Assays untersucht. Als Positivkontrolle für die Induktion zytotoxischer Effekte wurden HT-29/B6-GR/MR-Monolayer für 72 Stunden mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in einer Konzentration von 500 U/ml und 1000 U/ml behandelt. 24 Stunden nach Behandlung mit CDTa/b zeigte sich ein verminderter TER bei gleichzeitig nicht nachweisbarer Zytotoxizität, gemessen anhand der Freisetzung von LDH. Die Zellen, die mit IFN- $\gamma$  behandelt wurden, wiesen einen verminderten TER (Abbildung 2a) und eine korrelierende erhöhte Zytotoxizität auf (Abbildung 2b) (Heils et al., 2023).



(a)

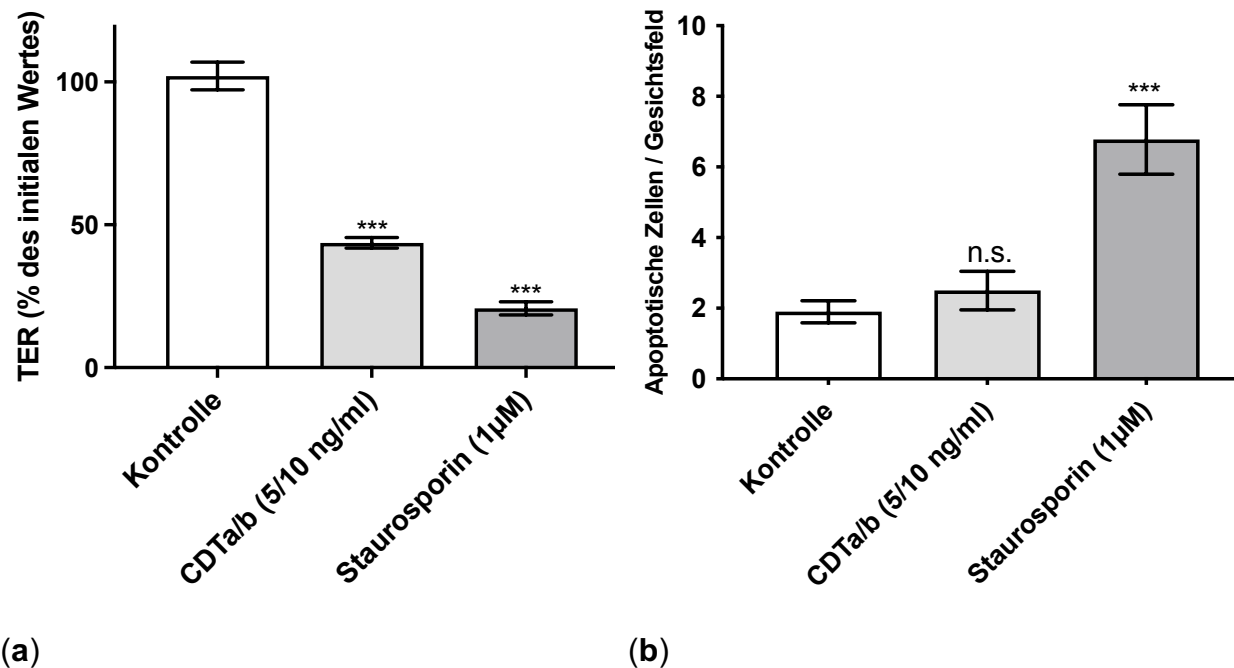




(b)

**Abbildung 2.** Barrierefunktion und Zytotoxizität in HT-29/B6-GR/MR-Monolayern nach Behandlung mit CDT. (a) TER 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml). In einem parallelen Experiment wurden HT-29/B6-GR/MR-Zellen mit 500 und 1000 U/l Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) für 72 Stunden als Positivkontrolle für die Induktion von Nekrosen behandelt. (b) Mittels eines LDH-Release Assays wurde die Induktion von zellulären Nekrosen als möglicher Zelltodmechanismus untersucht. Der maximale LDH-Release wurde durch Lyse von Zell-Monolayern mittels eines Detergens-Puffers ermittelt. n.s. = nicht signifikant, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Einweg-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen,  $n = 3-5$ . (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

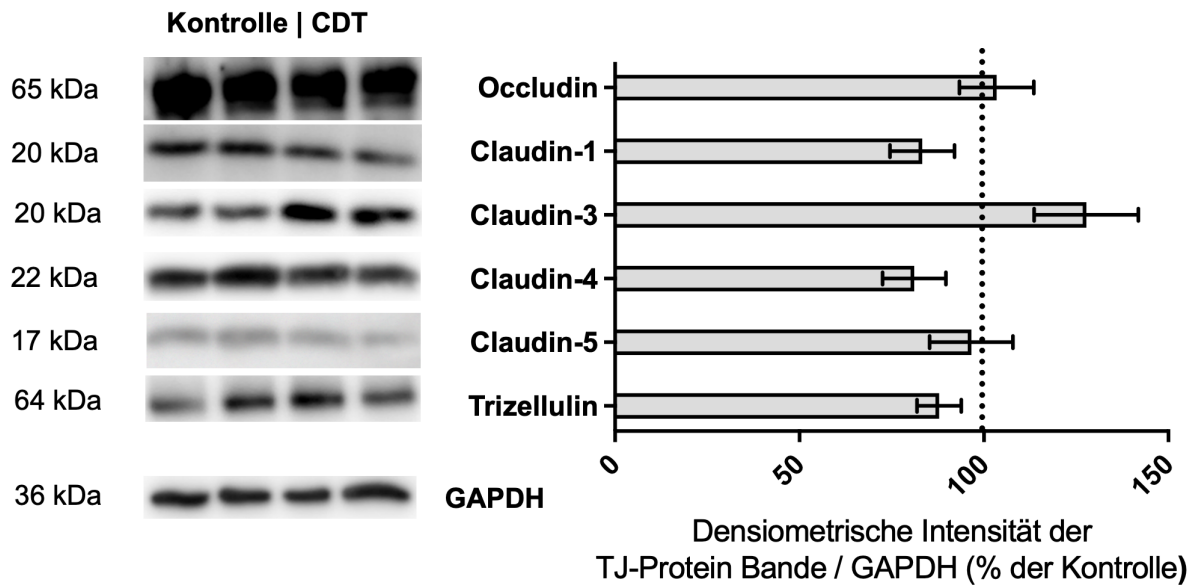
Eine weitere Ursache für die Störung der epithelialen Barrierefunktion kann die Induktion von Apoptose als Zelltodmechanismus sein. Um diese zu untersuchen, wurden mit einem TUNEL-Assay apoptotische Zellkerne markiert und fluoreszenzmikroskopisch pro Gesichtsfeld ausgezählt. Staurosporin in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  diente als Positivkontrolle. 24 Stunden nach Behandlung mit CDT zeigte sich keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen. Nach Zugabe von Staurosporin war die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld vierfach erhöht (Abbildung 3). Durch die Zugabe des Pancaspase-Inhibitors Q-VD-OPh (10  $\mu\text{M}$ ) konnte der Abfall des TER 24 Stunden nach Zugabe von CDT nicht vermindert werden ( $46 \pm 2\%$  des initialen TER in CDT-behandelten Monolayern versus  $44 \pm 2\%$  in mit CDT und Q-VD-OPh behandelten Monolayern, nicht signifikant,  $p = 0.41$ , t-Test,  $n = 5$ ) (Heils *et al.*, 2023).



**Abbildung 3.** Barrierefunktion und Apoptoserate in HT-29/B6-GR/MR-Monolayern nach Behandlung mit CDT. (a) TER 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml) oder mit 1 µM Staurosporin als Positivkontrolle für die Induktion von epithelialer Apoptose als Zelltodmechanismus. (b) Mit einem TUNEL-Assay wurden apoptotische Zellen durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch gezählt. n.s. = nicht signifikant, \*\*\* $P < 0.001$  einseitige-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen,  $n = 5-10$ . (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

### 3.3 Expression von Tight Junction-Proteinen nach Behandlung mit CDT

Neben der Induktion von Zelltodphänomenen kann eine Herunterregulierung von Proteinen des TJ-Komplexes eine Ursache für eine gestörte epitheliale Barriere darstellen. Die Expression der barrierebildenden TJ-Proteine Claudin-1, -3, -4, -5, Occludin und Trizellulin wurde mit einer densitometrischen Untersuchung von Western Blots untersucht. 24 Stunden nach Behandlung der HT-29/B6-GR/MR-Zellen mit CDT zeigte sich keine Veränderung der Expression der untersuchten TJ-Proteine (Abbildung 4) (Heils *et al.*, 2023).

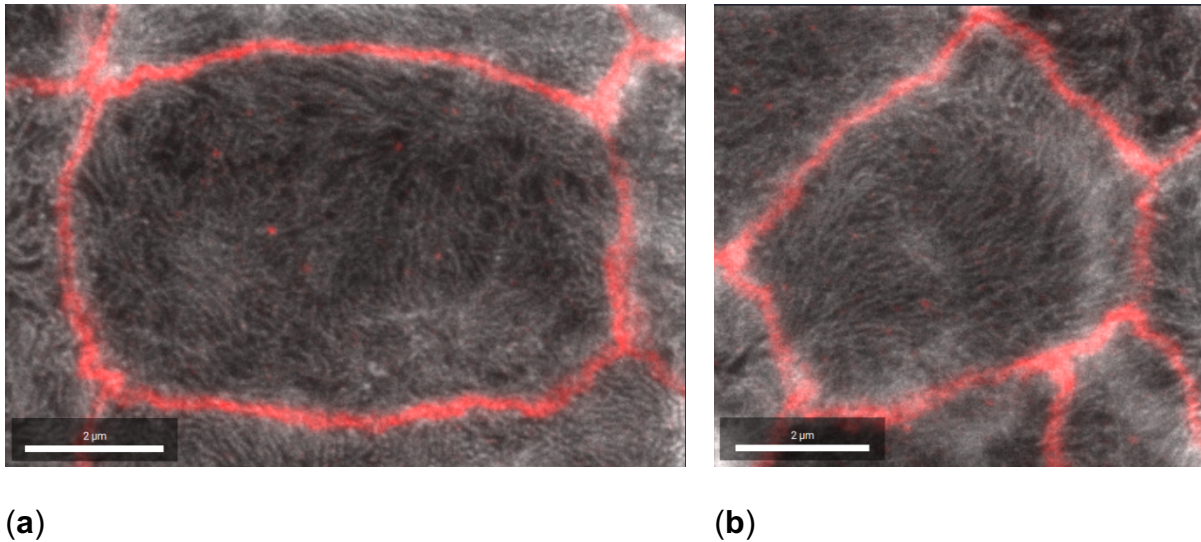


**Abbildung 4.** Western Blot-Analyse der Expression verschiedener TJ-Proteine in HT-29/B6-GR/MR-Zell-Monolayern 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml). Die Expression der TJ-Proteine wurde durch eine densitometrische Analyse bestimmt, auf die Expression der GAPDH normalisiert und als Prozentwert der unbehandelten Kontrolle dargestellt.  $n=4-6$ , nicht signifikant, t-Test mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen. (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

### 3.4 Mikrostrukturelle Analyse der Tight Junction nach Behandlung mit CDT

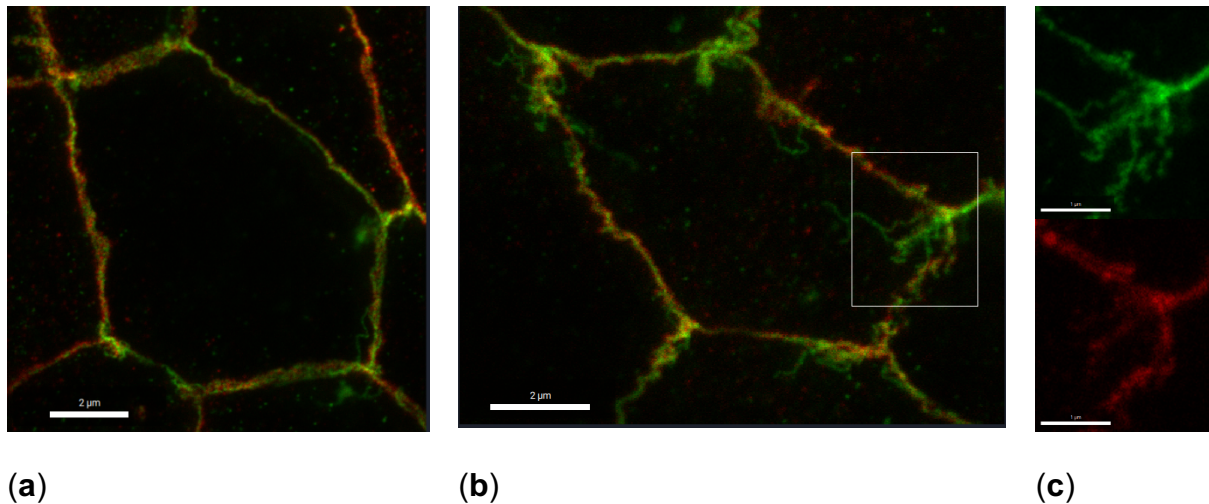
Die subzelluläre Lokalisation und Konfiguration verschiedener TJ-Proteine und des F-Aktin-Zytoskeletts wurde mittels hochauflösender STED-Mikroskopie untersucht. In der unbehandelten Kontrolle erscheint der TJ-Komplex, repräsentiert durch das Zonula occludens-Protein 1 (ZO-1), glatt und ohne Unterbrechungen (Abbildung 5a). Das durch Phalloidin gefärbte F-Aktin-Zytoskelett weist eine gleichmäßige, schmale kondensierte Konfiguration in Form eines perijunktionalen Rings und eine gleichmäßige netzartige intrazellulärer Verteilung auf. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle weisen die mit CDT behandelten Zellen eine aufgeraute, stark gewellte bizelluläre TJ auf. Zudem zeigte sich eine perijunktionale Kondensation des F-Aktin-Zytoskeletts, welche durch die vermehrte Intensität des F-Aktin-Signals repräsentiert wird. Intrazellulär erschien das F-Aktin-Zytoskelett im Vergleich zur Kontrolle unverändert in Filamenten organisiert (Abbildung 5b) (Heils *et al.*, 2023).

**ZO-1 F-Aktin**



**Abbildung 5.** Hochauflösende STED-Mikroskopie von HT-29/B6-GR/MR-Zellmonolayern mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (rot) und Färbung von F-Aktin mittels Phalloidin (weiß). (a) unbehandelte Kontrollzelle; (b) HT-29/B6-GR/MR-Zelle 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml). Balken = 2 µm. (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

Exemplarisch für die Proteinfamilie der barrierebildenden Claudinen wurde die Verteilung von Claudin-4 mittels hochauflösender STED-Mikroskopie betrachtet. In den unbehandelten Kontrollzellen ist Claudin-4 in einem schmalen Band in der bizellulären Junction nachweisbar. Zudem findet sich eine Co-Lokalisation mit ZO-1 (Abbildung 6a). Nach Behandlung der Zelllayer mit CDT ist Claudin-4 umverteilt und partiell in intrazellulären Strangformationen außerhalb der eigentlichen TJ lokalisiert. An diesen Stellen erscheint Claudin-4 nicht mit ZO-1 co-lokalisiert. Diese Beobachtung ist sowohl im Bereich der bizellulären Tight Junction (bTJ), aber insbesondere auch im Bereich der trizellulären Tight Junction (tTJ) ausgeprägt (Abbildung 6b & c) (Heils *et al.*, 2023).



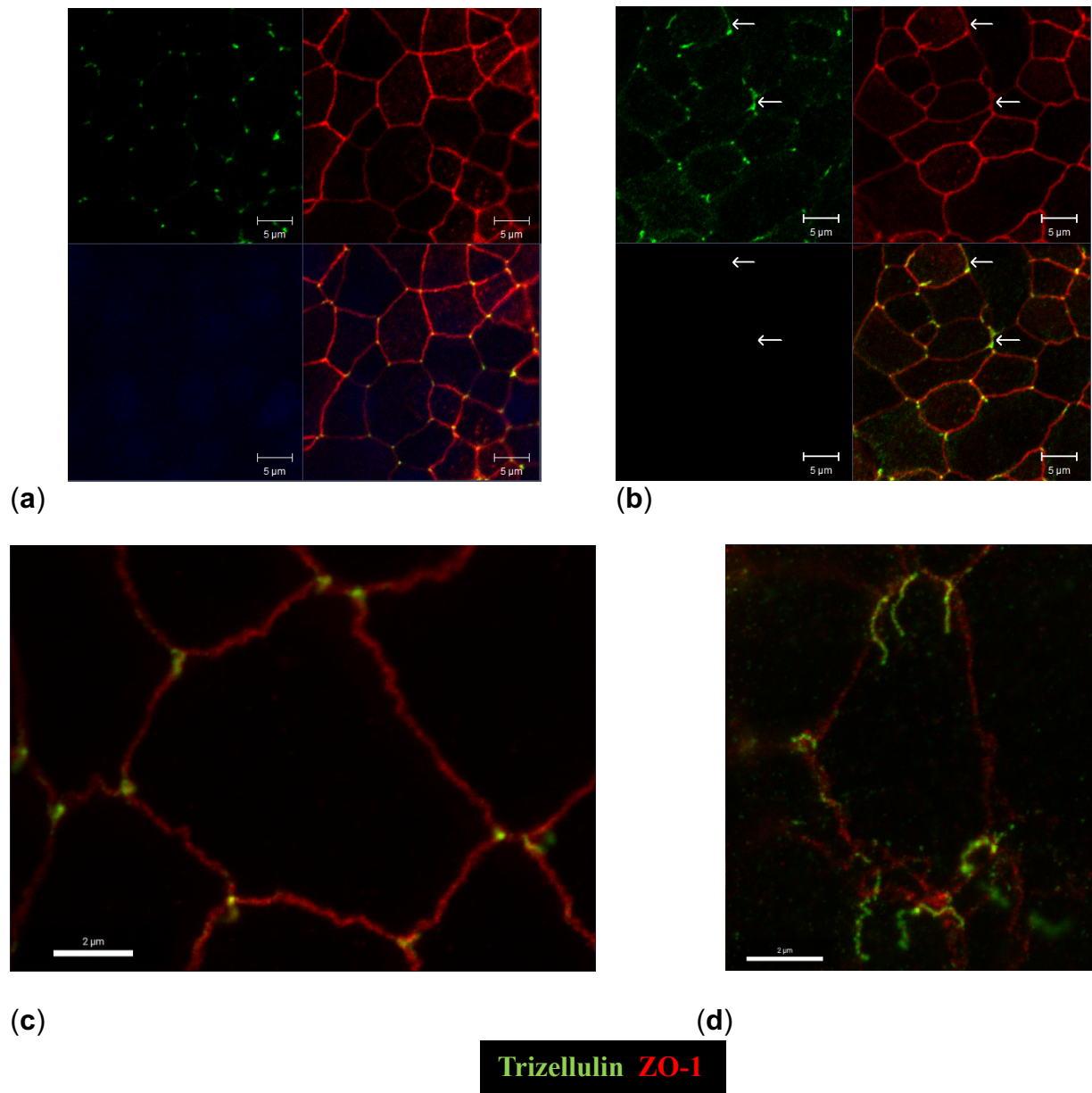
### Claudin-4 ZO-1 Überlagerung

**Abbildung 6.** Hochauflösende STED-Mikroskopie von HT-29/B6-GR/MR-Zellmonolayern mit Immunfluoreszenzfärbung von Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) (rot) und Claudin-4 (grün). (a) unbehandelte Kontrollzellen; (b) HT-29/B6-GR/MR-Zellen 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml); (c) Vergrößerte tTJ als Detaildarstellung des weiß markierten Bereichs in Abbildung 6 (b); Balken = 1  $\mu\text{m}$ . (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

### 3.5 Effekte von CDT auf die trizelluläre Tight Junction

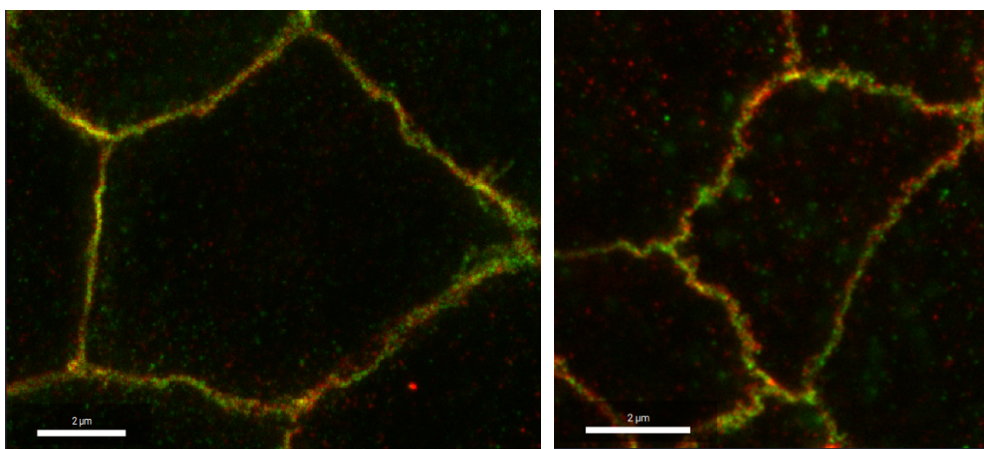
Die Konfiguration der tTJ wurde durch die immunchemische Färbung der TJ-Proteine Trizellulin und ZO-1 und anschließende Darstellung mit CLSM untersucht. In den unbehandelten Kontrollzellen ist das Signal von Trizellulin punktförmig in der tTJ lokalisiert. Nach Behandlung der HT-29/B6-GR/MR-Zellen zeigte sich ein Verlust der exklusiven Lokalisation von Trizellulin in der tTJ. Signalanreicherungen waren nunmehr auch in der bTJ nachweisbar. In der durchgeführten STED-Mikroskopie konnten diese Befunde mit höherer optischer Auflösung bestätigt werden. Zudem zeigten sich nach Behandlung mit CDT intrazelluläre, strangförmig konfigurierte Trizellulin-Proteinkomplexe (Abbildung 7) (Heils *et al.*, 2023).





**Abbildung 7.** Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) und hochauflösende STED-Mikroskopie von HT-29/B6-GR/MR-Zellmonolayern mit Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (rot) und Trizellulin (grün). (a) CLSM von unbehandelten HT-29/B6-GR/MR-Zellen; (b) CLSM von HT-29/B6-GR/MR-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit CDT mit Hervorhebung des Trizellulinsignals durch weiße Pfeile; (c) STED-Mikroskopie von unbehandelten HT-29/B6-GR/MR-Zellen; (d) STED-Mikroskopie von HT-29/B6-GR/MR-Zellen 24 Stunden nach Behandlung mit CDT. (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

Die Lokalisation und Anordnung des Proteins Occludin, welches funktionell mit Trizellulin interagiert und dies in seiner Lokalisation stabilisiert, wurde mittels STED-Mikroskopie untersucht. In der unbehandelten Kontrolle sind Occludin und ZO-1 in einem schmalen, glatten Band in der bTJ nachweisbar. Beide Signale sind co-lokalisiert. 24 Stunden nach Zugabe von CDT zeigt Occludin sich nicht mehr in einem schmalen, glatten Band in der bTJ, sondern die Signale von Occludin und ZO-1 erschienen im bTJ Band durch partielle Verbreiterungen quasi wie aufgeraut. Zudem zeigte sich ein partieller Verlust der Co-Lokalisation beider Proteine (Abbildung 8) (Heils et al., 2023).



(a)

(b)

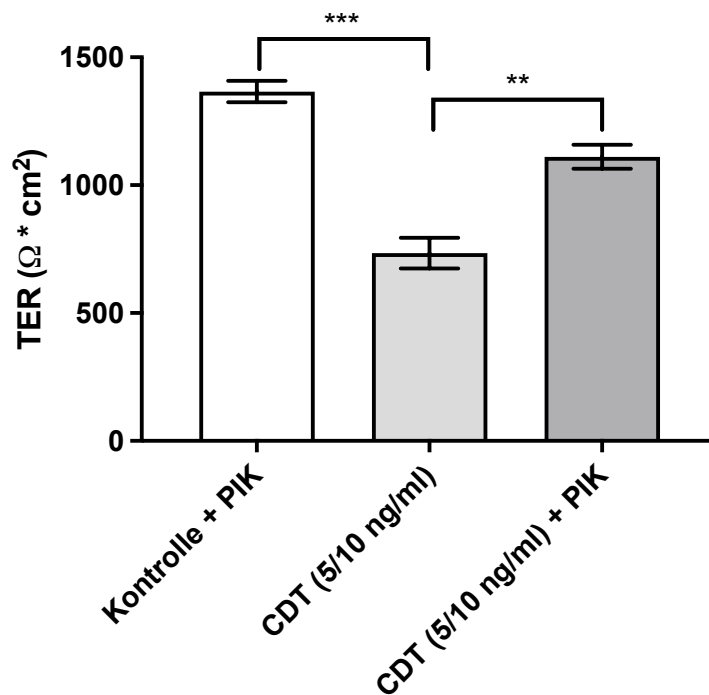
**Occludin ZO-1 Überlagerung**

**Abbildung 8.** Hochauflösende STED-Mikroskopie von HT-29/B6-GR/MR-Zellmonolayern mit Immunofluoreszenzfärbung von ZO-1 (rot) und Occludin (grün). (a) unbehandelte Kontrollzellen; (b) HT-29/B6-GR/MR-Zellen 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDTa/b (5/10 ng/ml); Balken = 2 µm. (modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

### 3.6 Disinhibition der CDT-induzierten Barrierestörung durch PIK, den Inhibitor der Myosin-leichte-Ketten-Kinase

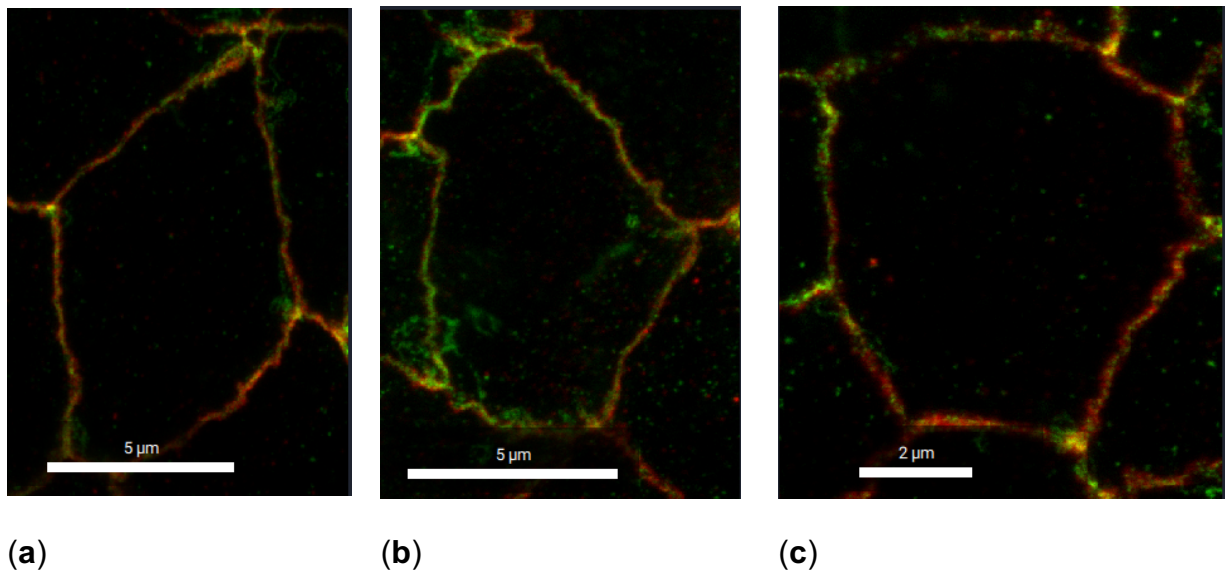
Eine mögliche Ursache der zuvor beschriebenen delokalisierten TJ-Proteine ist die Kontraktion des perijunktionalen Aktin-Zytoskeletts. Nach Behandlung der HT-29/B6-GR/MR-Zelllayer mit PIK, einem spezifischen Inhibitor der MLCK, konnte die durch CDT vermittelte Reduktion des TER nach 24 Stunden vermindert werden (Abbildung 9). In der STED-mikroskopischen Untersuchung der Lokalisation der TJ-Proteine ZO-1 und

Claudin-4 zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit PIK eine mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Verteilung dieser Proteine. Sowohl die Signale von ZO-1 als auch Claudin-4 sind in einem schmalen, glatten Band in der TJ nachweisbar (Abbildung 10). Zellen, die nur mit CDT behandelt wurden, weisen hingegen eine aufgeworfene TJ und eine Nachweisbarkeit von Claudin-4 in intrazellulär lokalisierten Strangformationen auf (Heils et al., 2023).



**Abbildung 9.** Ausbleiben des Defektes der epithelialen Barriere nach apikaler Behandlung mit CDT (5/10 ng/ml) durch den spezifischen MLCK-Inhibitor PIK in einer Konzentration von 200  $\mu$ M. Darstellung des TER 24 Stunden nach Zugabe von CDT und PIK. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 5$ , t-Test mit Bonferroni-Korrektur. (Abbildung modifiziert nach Heils et al., 2023)



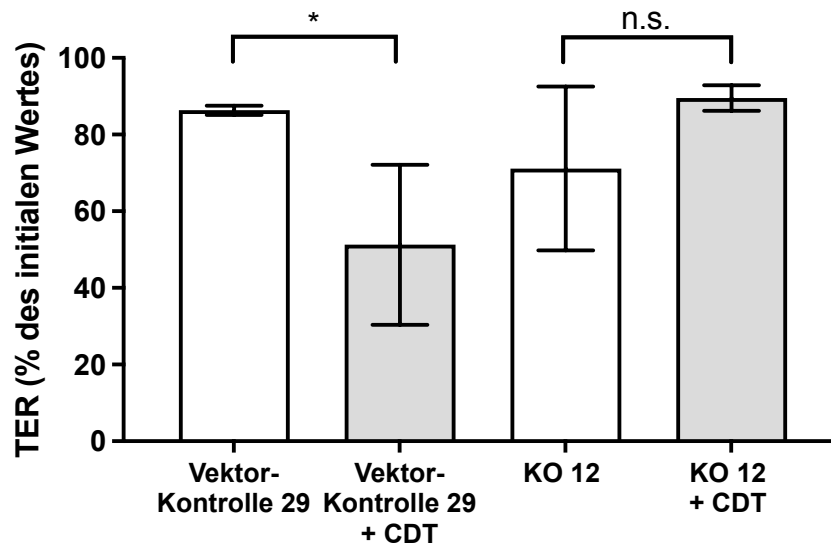


### Claudin-4 ZO-1 Überlagerung

**Abbildung 10.** Subzelluläre Lokalisation von Claudin-4 nach apikaler Behandlung mit CDT und protektiver Zugabe von 200 µM D-reverse PIK. Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-4 (grün) and ZO-1 (rot) und Visualisierung mittels hochauflösender STED-Mikroskopie (a) unbehandelte Kontrollzelle, Balken = 5 µm; (b) Zelle 24 Stunden nach Behandlung mit CDT, Balken = 5 µm; (c) Zelle 24 Stunden nach Behandlung mit CDT und PIK, Balken = 2 µm. (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

### 3.7 Abhängigkeit der CDT-induzierten Barrierestörung vom Lipolyse-stimulierten Lipoprotein-Rezeptor LSR

Um die Abhängigkeit der Effekte subtoxischer Konzentrationen des binären *C. difficile*-Toxins CDT von dem Vorhandensein des LSR zu untersuchen, wurden die Effekte von CDT auf HT-29/B6-Monolayer mit einem stabilen LSR-Knockout untersucht. Vektorkontrollen, welche mit CDT behandelt wurden, wiesen nach 24 Stunden einen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verminderten TER auf (Abbildung 11). HT-29/B6-Monolayer mit LSR-Knockout hingegen zeigten keine Veränderung des TER nach Zugabe von CDT im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 11).



**Abbildung 11.** Epitheliale Barrierefunktion in Abhängigkeit des Vorhandenseins des CDT-Rezeptors LSR 24 Stunden nach apikaler Behandlung mit CDT (5/10 ng/ml). Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) in HT-29/B6-Zellen mit LSR-Knockout und Vektorkontrollen [21]. \* $p < 0.05$ , n.s. = nicht signifikant.  $n = 3$ , t-Test. (Abbildung modifiziert nach Heils *et al.*, 2023)

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

*Clostridioides difficile* ist ein obligat anaerobes Bakterium und der häufigste Auslöser antibiotikaassoziierter Diarrhoen (Abt et al., 2016; Magill et al., 2014). Als Virulenzfaktoren produziert *C. difficile* die Toxine TcdA und TcdB (Aktories et al., 2017). Hypervirulente Stämme, welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert sind, zeichnen sich zusätzlich durch die Produktion des binären *C. difficile*-Toxins CDT aus (Gerding et al., 2013). Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Auswirkungen subtoxischer Konzentrationen des CDT auf die epitheliale Barriere in einem HT-29/B6-GR/MR-Zellkulturmodell untersucht.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Wirkung des CDT auf die funktionelle Integrität der epithelialen Barriere. Der transepitheliale Widerstand TER ist ein Maß für die Permeabilität eines Epithels gegenüber Ionen. 24 Stunden nach Behandlung mit CDT war der TER um mehr als 50% reduziert. Gleichzeitig konnte eine deutlich gesteigerte Permeabilität der HT-29/B6-GR/MR-Monolayer für die makromolekularen Marker Fluorescein und FITC-Dextran 4 kDa nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen eine deutliche Einschränkung der epithelialen Barrierefunktion gegenüber Ionen und Makromolekülen. Die Störung der epithelialen Barrierefunktion kann ursächlicher Pathomechanismus für die Entstehung einer intestinalen Entzündung und von Diarrhöen sein. Bedingt durch eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle kommt es zu einem Influx luminaler Antigene wie dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) in den portalen Blutstrom mit anschließender Aktivierung des mukosalen Immunsystems. Eine anschließende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin 1-beta oder Interleukin-13 kann die epitheliale Barrierefunktion weiter verstärken (Camilleri, 2019). Dieses Konzept wird in der Literatur als Leaky-Gut-Phänomen beschrieben und ist relevant im Kontext verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen wie beispielsweise einer Infektion mit *Campylobacter jejuni* (Lobo de Sá et al., 2019) oder auch chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Krug, 2017).

Eine mögliche Erklärung für die festgestellte Barriestörung können direkte Effekte der b-Untereinheit des CDT sein. Nach Bindung des CDTb an den Rezeptor LSR akkumuliert

dieser Komplex in cholesterinreichen Mikrodomänen in der Zellmembran und formt Heptamere aus. Diese binden nicht nur CDTa und vermitteln dessen Endozytose, sondern bilden auch eine Pore aus, über welche Calcium in die Zelle einströmen kann (Sheedlo et al., 2020). Ein durch porenformende Toxine bedingter Einstrom von Calcium kann neben der Induktion von Zelltodphänomenen, zu einer Aktivierung der MLCK und einer folgenden Disruption von TJ-Proteinen führen. Dieser Mechanismus ist für hohe Konzentrationen des CDTb (Landenberger et al., 2021) und für die Toxine AerA (von *Aeromonas hydrophila*) (Bücker et al., 2011) und HlyA (aus B2 *Escherichia coli*) (Schulz et al., 2021) beschrieben. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CDTb-Konzentration von 10 ng/ml konnten ohne gleichzeitige Zugabe von CDTa keine Effekte auf den TER beobachtet werden und eine Reduktion des TER nach 24 Stunden war erst bei einer Konzentration von 3000 ng/ml zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein CDTb-vermittelten Calciumeinstrom nicht ursächlich für die beobachteten Auswirkungen des CDT in geringen Konzentrationen ist. Die  $\alpha$ -Untereinheit des CDT hatte ohne gleichzeitige Zugabe von CDTb keinen Effekt auf den TER. Hieraus ist zu schließen, dass für eine Wirkung der verwendeten Konzentrationen des binären Toxins beide Untereinheiten notwendig sind.

Als weiteren möglichen Grund für eine Störung der epithelialen Barriere ist das Auftreten von Nekrosen oder Apoptosen im Epithelverband des Darmes anzusehen. In hohen Konzentrationen zeigt CDT relevante zytotoxische und zytopathische Effekte durch eine Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts (Aktories et al., 2017; Gülke et al., 2001). Zudem ist eine Apoptoseinduktion bei hohen CDT-Konzentrationen beschrieben (Payne et al., 2013). Um den Beitrag zytotoxischer Effekte auf die funktionelle Störung der epithelialen Barriere bei geringen CDT-Konzentrationen von 5 ng/ml CDTa und 10 ng/ml CDT zu untersuchen, wurde ein LDH-Release-Assay durchgeführt. In diesem war keine erhöhte Zytotoxizität zu beobachten. Eine mögliche Induktion von Apoptose wurde mit einem TUNEL-Assay untersucht. Es zeigte sich kein erhöhter Nachweis apoptotischer Zellen. Zudem konnte eine pharmakologische Inhibition der epithelialen Apoptoseaktivität die Effekte des CDT nicht vermindern. Die funktionelle Störung der Barriere durch niedrige CDT-Konzentrationen ist daher weder auf eine Induktion von Nekrosen noch auf eine gesteigerte Apoptoserate im Darmepithel zurückzuführen. Aus diesem Grund ist die in dieser Arbeit verwendete Konzentration des CDT als subtoxisch anzusehen.

Eine weitere Ursache für eine eingeschränkte epitheliale Barrierefunktion kann eine veränderte Proteinexpression der barrierelevanten TJ-Proteine sein. Um zu untersuchen, ob CDT in subtoxischen Konzentrationen eine Expressionsveränderung bewirkt, wurden die TJ-Proteine Claudin-1, -3, -4, -5, Occludin und Trizellulin mittels Western Blot untersucht. Die Expression dieser Proteine war im Vergleich zur Kontrolle aber unverändert. Daher ist die beobachtete funktionelle Beeinträchtigung der epithelialen Barriere nicht auf eine veränderte Proteinexpression der untersuchten TJ-Proteine zurückzuführen.

Neben einer veränderten Expression kann aber auch eine veränderte subzelluläre Lokalisation von TJ-Proteinen ursächlich für eine Barrierestörung sein. Die Untersuchung des barrierebildenden TJ-Proteins Claudin-4 zeigte den partiellen Verlust der physiologischen Lokalisation. Im Bereich der tTJ konnten intrazelluläre Akkumulationen von Claudin-4 nachgewiesen werden. Claudin-4 ist das meistvorkommende intestinale Claudin und wurde als ein häufiger Repräsentant der barrierebildenden Claudine im Darm in dieser Arbeit untersucht (Shashikanth et al., 2022). Die Funktion dieses und weiterer TJ-Proteine ist unter anderem die Abdichtung des Darmepithels gegenüber luminalen Molekülen (Günzel & Fromm, 2012). Eine gestörte Lokalisation der barrierebildenden Claudine erklärt den Verlust der Barrierefunktion gegenüber diesen Proteinen.

Bedingt durch den Nachweis der Claudin-4-Strangformationen im Bereich der tTJ rückte diese in den Fokus der weiteren Untersuchung. Auch für das TJ-Protein Trizellulin konnte ein Verlust der physiologischen Lokalisation gezeigt werden. Nach Behandlung mit CDT war Trizellulin nicht mehr ausschließlich in der tTJ nachweisbar. Dieses, für die Abdichtung des Kontaktpunktes von drei oder mehr Zellen verantwortliche Protein (Krug et al., 2009), ist nach CDT-Zugabe auch in der bTJ und intrazellulär lokalisiert. Eine Dislokation des TJ-Proteins Trizellulin wird aber als ursächlich für eine gesteigerte makromolekulare Permeabilität im Sinne des Leaky-Gut-Konzeptes diskutiert (Krug et al., 2018) und ist somit eine Erklärung für die Barrieredysfunktion durch CDT.

Die mikroskopische Betrachtung von Occludin zeigte eine aufgeraute TJ und einen partiellen Verlust der Co-Lokalisation mit ZO-1. Die biologische Funktion von Occludin ist unter anderem die Stabilisierung der Lokalisation von TJ-Proteinen wie Trizellulin

während des dynamischen Prozesses des Auf- und Abbaus der TJs (Ikenouchi et al., 2008). Die CDT-vermittelte Destabilisierung des Occludins und damit der Verlust seiner Funktion ist eine weitere mögliche Ursache der nachgewiesenen Barrierefunktionsstörung. Insgesamt stellt die gestörte Lokalisation der TJ-Proteine, insbesondere von Claudin-4 und Trizellulin, eine Erklärung der CDT-vermittelten Barrieredysfunktion dar.

In der STED-Mikroskopie erfolgte außerdem der Nachweis eines morphologisch weitestgehend intakten intrazellulären Aktin-Zytoskeletts. Zusätzlich zeigte sich aber eine perijunktionale Aktin-Kondensation. Diese mikroskopischen Befunde und die aufgeraute TJ-Konfiguration weisen Gemeinsamkeiten zur MLCK-abhängigen TJ-Störung durch Microcystin auf, das Toxin der Blaualge *Microcystis* spp. (Kaak et al., 2022). Eine Aktivierung der MLCK bewirkt über eine Kontraktion des perijunktionalen Aktin-Zytoskeletts eine Destabilisierung der bTJ. Als Folge einer MLCK-Aktivierung werden strangformende TJ-Proteine wie Claudin-4 und akzessorische TJ-Proteine wie ZO-1 aus der TJ herausortiert (Jin & Blikslager, 2020). Um einen möglichen MLCK-abhängigen Mechanismus der Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere zu untersuchen, wurde der spezifische MLCK-Inhibitor PIK genutzt. Dieser war in der Lage, den CDT-vermittelten Abfall des TER nahezu vollständig zu verhindern. Zusätzlich wurde die Störung der TJ durch CDT, repräsentiert durch die veränderte Lokalisation von Claudin-4 und die aufgerauten TJ-Strands, durch die Inhibition der MLCK wirksam gehemmt. Hieraus ist zu schließen, dass die Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere – zumindest teilweise – durch eine Aktivierung der MLCK vermittelt wird. Eine mögliche Ursache für diese Aktivierung ist die Veränderung des Phosphorylierungsstatus verschiedener zellulärer Signaling-Proteine durch CDTa. Die  $\alpha$ -Untereinheit des binären Toxins führt unter anderem zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Calmodulin-Kinase (CAMK)-Motiven (Stieglitz et al., 2021). Die Aktivierung der MLCK erfolgt wiederum über eine Phosphorylierung ihres CAMK-Motivs (Jin & Blikslager, 2020).

Obwohl die Barriestörung bei subtoxischer CDT-Konzentration nicht ausschließlich auf die porenformenden Eigenschaften von CDTb zurückzuführen ist, ist ein Effekt durch einen Calciumeinstrom wahrscheinlich. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer CAMK-vermittelten Aktivierung der MLCK (Jin & Blikslager, 2020). In Kombination können die durch die  $\alpha$ -Untereinheit des binären Toxins induzierte Änderung

des Phosphoproteasoms und der CDTb-vermittelte Calciumeinstrom die Aktivierung der MLCK in unseren Experimenten erklären.

Abschließend wurde die Abhängigkeit der Effekte subtoxischer CDT-Konzentrationen von LSR untersucht. Dieses im Bereich der tTJ lokalisierte Protein ist der Rezeptor für CDTb (Masuda et al., 2011). Der Rezeptor für das binäre *C. difficile*-Toxin ist somit - im Gegensatz zu den Hauptrezeptoren der großen *C. difficile*-Toxine TcdA und TcdB (Aktories et al., 2017) - in der apikalen Zellmembran verortet. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass für die Wirkung subtoxischer CDT-Konzentrationen das Vorhandensein des LSR notwendig ist. Dies bestätigt bereits publizierte Daten, welche an einem HCT116-Zellkulturmodell (Hemmasi et al., 2015) und einem HAP1-Zellkulturmodell (Papatheodorou et al., 2011) erhoben wurden. CDT könnte nach LSR-Bindung und Störung der epithelialen Barrierefunktion den Eintritt der großen Toxine TcdA und TcdB in die Darmwand ermöglichen und so die Hypervirulenz der CDT-exprimierenden Stämme vermitteln.

#### **4.2 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand**

Im Rahmen dieser Studie wurden die Effekte subtoxischer Konzentrationen des binäre *C. difficile*-Toxins CDT auf die epitheliale Barriere untersucht. Bisher wurden für dieses Toxin angenommen, dass durch die ADP-Ribosylierung das Aktin-Zytoskelett vollständig zusammenbricht. Hieraus würden zytotoxische und zytopathische Effekte resultieren, welche einen Beitrag zur Hypervirulenz CDT-produzierender *C. difficile*-Stämme leisten (Aktories et al., 2017). Die im Rahmen dieser Studie verwendete CDT-Konzentration weist keine relevante Induktion der Zelltodphänomene Apoptose und Nekrose auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Aktin-Zytoskelett bei subtoxischen CDT-Konzentrationen weiterhin intakt ist und eine perijunktionale Kondensation aufweist. Ein maßgeblicher Unterschied zu den bisherigen Untersuchungen der epithelialen Wirkung des CDT ist die hier verwendete, im Vergleich zu anderen Studien niedrige Konzentration des CDT (5 ng/ml CDTa und 10 ng/ml CDTb) und der vergleichbar lange Beobachtungszeitraum von 24 Stunden. Durch die Verwendung subtoxischer Konzentrationen konnte mit der MLCK-vermittelten Störung der epithelialen Barriere ein neuer Wirkmechanismus des CDT identifiziert werden, welcher einen Beitrag zur Hypervirulenz leistet.

Es werden verschiedene Mechanismen, die zur Hypervirulenz der CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämmen wie dem RT027 beitragen, diskutiert. Einer dieser Mechanismen ist die direkte Zytotoxizität des CDT (Aktories et al., 2017; Gülke et al., 2001; Landenberger et al., 2021). Gegen die Hypothese, dass die Hypervirulenz durch die Zytotoxizität bedingt wird, spricht beispielsweise, dass *C. difficile*-Stämme, welche nur CDT produzieren, aber keine großen Toxine TcdA und TcdB besitzen, im Tierexperiment mit Hamstern lediglich das Kolon der Tiere kolonisieren, aber zu keiner Erkrankung geführt haben (Geric et al., 2006). Die Produktion von ausschließlich CDT, aber nicht die großen Toxine TcdA und TcdB, produzierenden *C. difficile*-Stämme scheint nicht suffizient für das Auslösen einer Infektion zu sein.

Eine weitere mögliche Ursache der Hypervirulenz ist eine gesteigerte Bildung von TcdB in CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämmen. Es wurde gezeigt, dass der im genetischen Locus des CDT codierte Regulator der Expression des binären Toxins auch die Produktion von TcdB steigert (Lyon et al., 2016). Anwar et al., 2022 konnten jedoch zeigen, dass klinische Isolate des hypervirulenten Ribotypen 027 eine stark unterschiedliche Produktion der Toxine TcdA und TcdB aufweisen. Interessanterweise weisen sämtliche von Anwar et al., 2022 untersuchten Stämme eine vergleichbare Letalität im Tierexperiment mit Hamstern auf, welche unabhängig von der gemessenen Konzentration der Toxine TcdA und TcdB ist (Anwar et al., 2022). Diese Befunde sprechen gegen die Annahme, dass die Hypervirulenz ausschließlich durch eine gesteigerte TcdB-Produktion bedingt ist.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Hypervirulenz ist eine gesteigerte Adhärenz hypervirulenter *C. difficile*-Stämme an das Darmepithel. Dies wurde auf die Protrusionen der Mikrotubuli zurückgeführt, welche durch CDT vermehrt ausgebildet werden (Schwan et al., 2009). In dieser Hypothese sind die zugrunde liegenden Mechanismen der Hypervirulenz aber nicht abschließend verstanden (Gerding et al., 2013).

Die hier dargelegte Schädigung der epithelialen Barriere kann als eigenständiger, additiver Pathomechanismus im Sinne des Leaky-Gut-Konzeptes angesehen werden, welcher zur Hypervirulenz der CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämme beiträgt. Für subtoxische CDT-Konzentrationen konnte eine Schädigung der bi- und trizellulären TJ gezeigt werden. Hieraus resultiert eine erhöhte Permeabilität der epithelialen Barriere



gegenüber Makromolekülen wie dem bakteriellen Endotoxin LPS. In Konsequenz dessen können luminale bakterielle Antigene in die Mukosa des Darms eindringen. Dies bewirkt wiederum eine Aktivierung von subepithelial lokalisierten Immunzellen und eine Inflammation, welche wiederum die epitheliale Barriere weiter schädigen kann (Camilleri, 2019).

Bei einer Öffnung des parazellulären Durchtrittswegs für Makromoleküle ist auch ein erleichterter Durchtritt der großen *C. difficile*-Toxine TcdA und TcdB zu erwarten. In der Literatur wird diskutiert, dass eine verstärkte Aktivierung mukosaler Immunzellen durch den epithelialen Durchtritt von TcdA und TcdB bei einer *C. difficile*-Infektion zu einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf führt (Marquardt et al., 2021; Nibbering et al., 2021). Zudem erleichtert eine gestörte epitheliale Barriere - zumindest hypothetisch - auch den Zugang der großen *C. difficile*-Toxine TcdA und TcdB zu ihren basolateral lokalisierten Rezeptoren wie Frizzled und CSPG4. Dieser Rezeptorkontakt und die nachfolgende Endozytose sind notwendige Bedingungen für die zelluläre Wirkung dieser Toxine. Dies stellt einen neuen, möglichen Erklärungsansatz für die Hypervirulenz CDT-produzierender *C. difficile*-Stämme dar.

### **4.3 Stärken und Schwächen der Studie**

#### **4.3.1 Stärken der Studie**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Auswirkung subtoxischer Konzentrationen des binären *C. difficile*-Toxins CDT auf die epitheliale Barriere beschrieben. Als Stärke ist die Kombination von funktionellen Messungen mit mikroskopischen Verfahren zu nennen. Auf Grundlage dieser Untersuchungen konnte ein bisher unbekannter Wirkmechanismus des CDT auf die epitheliale Barriere beschrieben werden. Dieser tritt bereits bei geringen Konzentrationen des Toxins auf und stellt einen Erklärungsansatz für die Hypervirulenz der CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämme dar. Nachfolgend werden die interne und externe Validität und in diesem Rahmen auch die Schwächen der Arbeit diskutiert.

#### 4.3.2 Interne Validität

Für die Analyse einer funktionellen Einschränkung der epithelialen Barriere wurden der TER und die Permeabilität für die Makromoleküle Fluorescein und 4 kDa FITC-Dextran untersucht. Beide Methoden sind weitreichend etabliert, robust und häufig verwendet zur Evaluation einer Barrierefunktionsstörung (vergleiche beispielsweise Bücken et al., 2011; Kaak et al., 2022 und Lobo de Sá et al., 2019). Der TER wurde bei allen Versuchen dieser Arbeit als Kontrolle für die Induktion einer Barriestörung mitgeführt. Als Kriterium hierfür wurde ein im Vergleich zur Ausgangsmessung um mindestens 40% reduzierter TER definiert.

Mit dem LDH-Release- und TUNEL-Assay wurden zwei kommerziell erhältliche und häufig verwendete biologische Tests zur Untersuchung der Induktion von Zelltodphänomenen verwendet. Das Mitführen von Positivkontrollen (Interferon- $\gamma$  und Staurosporin) bestätigt die Zuverlässigkeit der durchgeführten Assays. Dennoch ist zu bedenken, dass es sich bei dem verwendeten Zellkulturmodell um eine immortalisierte Kolonkarzinom-Zelllinie handelt und diese möglicherweise veränderte Zelltodprozesse oder zumindest eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber der Auslösung von Zelltodprozessen im Vergleich zum Gewebe von PatientInnen aufweisen. Des Weiteren wurden nur die Zelltodmechanismen Nekrose und Apoptose untersucht und andere Mechanismen wie die Nekroptose, Autophagie oder Pyroptose nicht berücksichtigt. Eine Untersuchung dieser wäre eine relevante Ergänzung der durchgeführten Versuche.

Die Analyse der Expression verschiedener TJ-Proteine mittels Western Blots ist eine sehr häufig verwendete Methode zur quantitativen Analyse der Proteinexpression und als sehr gut etabliert anzusehen.

Im Rahmen der mikroskopischen Analyse der subzellulären Lokalisation verschiedener TJ-Proteine wurde mit Claudin-4 der am häufigsten vorkommende Vertreter dieser Proteinfamilie in der bTJ untersucht. Die mikroskopischen Befunde an den Kontrollzellen sind vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen Konfiguration der bi- und trizellulären TJ (vergleiche beispielsweise (Bücken et al., 2011; Lobo de Sá et al., 2019)).

Neben der konventionellen CLSM wurde für diese Studie die STED-Mikroskopie verwendet. Diese hat durch die Verwendung eines ringförmigen Depletionslasers eine deutlich höhere optische Auflösung (Vicidomini et al., 2018) und ist beispielsweise in der Lage, einzelne intrazelluläre TJ-Stränge zu visualisieren (Heils et al., 2023). Durch die

Verwendung dieser Technik konnten die Veränderungen der TJ hochauflösend untersucht und beschrieben werden.

Die beschriebene perijunktionale Kontraktion des Zytoskelettes und das aufgeraute Erscheinungsbild der TJ-Strands wurde als Indikator für eine MLCK-vermittelte Toxinwirkung interpretiert. Diese Befunde, die auf die MLCK-vermittelte Störung der TJ hindeuten, weisen eine hohe Ähnlichkeit zur Wirkung anderer bakterieller Toxine wie dem Microcystin (aus *Microcystis* spp.) auf (Bücker et al., 2011; Kaak et al., 2022). Durch die spezifische Inhibition der MLCK konnte die Hypothese der MLCK-vermittelten Barriestörung bestätigt werden. Mit der CDT-vermittelten gesteigerten Phosphorylierung von CAMK-Motiven und der CDTb-bedingten gesteigerten intrazellulären Calciumkonzentration wurden zudem zwei weitere wahrscheinliche Mechanismen des Einflusses von CDT auf die MLCK diskutiert. Ein direkter Nachweis einer gesteigerten MLCK-Aktivität wurde jedoch nicht erbracht. Eine weiterführende Untersuchung der Interaktion zwischen CDT und der MLCK ist daher relevant für ein umfassenderes Verständnis der durch CDT induzierten intestinalen Barriestörung. So wäre es beispielsweise sinnvoll, den Phosphorylierungsstatus der MLCK nach Behandlung mit CDT mittels Western Blot zu untersuchen, um eine gesteigerte Phosphorylierung der MLCK direkt nachzuweisen.

Sämtliche Ergebnisse wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert. Die Interpretation der mikroskopischen Befunde erfolgte durch mindestens zwei UntersucherInnen.

#### 4.3.3 Externe Validität

Für die Untersuchung der Effekte subtoxischer Konzentrationen des CDT wurde ein HT-29/B6-Zellkulturmodell ausgewählt, da es sich um ein weitreichend etabliertes Modell zur Untersuchung der intestinalen Barriere handelt. In diesem HT-29/B6-Modell wurden beispielsweise die Auswirkungen verschiedener Bakterien wie *Aeromonas hydrophilia* (Bücker et al., 2011) und *Campylobacter jejuni* (Lobo de Sá et al., 2019) und verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Heller et al., 2005) auf die epitheliale Barriere untersucht.

Da es sich bei der *C. difficile*-Infektion um eine Pathologie des Kolons handelt, sind HT-29/B6-GR/MR-Zellen als Kolonzelllinie zur Untersuchung der CDT-Effekte geeignet. Das Modell zeichnet sich zudem durch seine einfache experimentelle Handhabung aus.

Außerdem ist die Interpretation der erhobenen Daten im Vergleich zu komplexeren Modellen wie einem Tiermodell vereinfacht, da weniger mögliche Confounder-Variablen wie der Einfluss des Immunsystems zu berücksichtigen sind.

Aufgrund dessen ist das verwendete Modell gut geeignet, um die bislang nicht erforschten Auswirkungen subtoxischer CDT-Konzentrationen auf die epitheliale Barriere zu untersuchen. Eine direkte Übertragbarkeit auf andere biologische Modelle und die menschliche *C. difficile*-Infektion ist jedoch nur eingeschränkt gegeben. So ist beispielsweise der Beitrag des dargestellten Wirkmechanismus von CDT in der humanen Pathophysiologie nur schwer abschätzbar, da diese durch verschiedene simultane bzw. sequenzielle Effekte gekennzeichnet ist wie z.B. von TcdA, TcdB oder dem Immunsystem. Trotz der nur eingeschränkten Übertragbarkeit auf andere Modelle und auf die menschliche Pathophysiologie ist das Versuchsdesign für die Gewinnung von initialen Erkenntnissen über die Wirkung subtoxischer CDT-Konzentrationen und die Generierung von Hypothesen zur Wirkweise geeignet. Die Überprüfung dieser in einem Modell höherer biologischer Komplexität wie einem Organoid- oder Tiermodell und an menschlichen Biopsien ist aber sinnvoll.

#### **4.4 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung**

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden an einem HT-29/B6-Zellkulturmodell durchgeführt. Dieses Modell ist für die Untersuchung der Auswirkung von Toxinen auf die epitheliale Barriere geeignet und gut etabliert, weist aber zugleich - wie zuvor diskutiert - eine im Vergleich zu anderen Modellen reduzierte biologische Komplexität auf. Eine Überprüfung der dargestellten Erkenntnisse und die Untersuchung der Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere in weiteren biologischen Modellen, wie einem Organoid- oder Tiermodell und an menschlichen Biopsien, erscheint notwendig. Außerdem eignen sich diese Modelle besser, um die zuvor dargestellten Mechanismen der Entstehung von Diarrhoen zu analysieren, welche in der Pathophysiologie von Infektionen mit hypervirulenten *C. difficile*-Stämmen relevant sein können. So ist beispielsweise bei der Untersuchung des Leaky-Gut-Konzeptes die Frage interessant, welche Auswirkungen eine CDT-vermittelte Öffnung der epithelialen Barriere und die damit verbundene Steigerung der Permeabilität für Makromoleküle wie dem Endotoxin LPS auf das im Subepithel lokalisierte Immunsystem hat.

Die dargestellte Hypothese, dass CDT die epitheliale Barriere öffnet und damit den Zugang der Toxine TcdA und TcdB zu den basolateral lokalisierten Rezeptoren wie Frizzled und CSPG4 (Aktories et al., 2017) erleichtert, sollte im Rahmen weiterführender Forschung ebenfalls untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Wirkung des CDT auf die epitheliale Barriere zeigte sich abhängig von der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Durch die Inhibition der MLCK konnten die Effekte des CDT inhibiert werden. Als mögliche Erklärungen für diese Wirkung wurden ein CDTb-vermittelter Einstrom von Calcium und die CDTa-vermittelte Veränderung des Phosphoproteasoms diskutiert. Gegenstand weiterführender Forschung sollte die Untersuchung dieser und weiterer möglicher Mechanismen der Interaktion von CDT mit der MLCK sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induktion einer Barrierestörung durch CDT als Pathomechanismus des *C. difficile* beschrieben. Ein Ziel zukünftiger Forschung kann die Identifikation und Evaluierung von Substanzen sein, die protektiv beziehungsweise restaurierend auf die epitheliale Barriere wirken und somit bei oraler oder parenteraler Gabe einen therapeutischen Ansatz für schwerwiegende CDI darstellen.

## 5 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss subtoxischer Konzentrationen des binären *C. difficile*-Toxins CDT auf die epitheliale Barriere in einem HT29/B6-GR/MR-Zellmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CDT bereits in vergleichbar geringen Konzentrationen die epitheliale Barrierefunktion beeinträchtigt, ohne in relevantem Maße Nekrose oder Apoptose zu induzieren.

Bei unveränderter Proteinexpression wurde eine gestörte Lokalisation verschiedener barriererelevanter TJ-Proteine wie Claudin-4 und Trizellulin nachgewiesen. Mit diesen Befunden korrelierte ein aufgeworfenes Signal der TJ-Strand Struktur und eine perijunktionale Kondensation des Aktin-Zytoskeletts in der CLSM- und STED-Mikroskopie. Zudem konnten die Effekte von CDT auf die epitheliale Barriere durch die spezifische Inhibition der MLCK aufgehoben werden.

Es zeigte sich, dass CDT über einen MLCK-abhängigen, durch das Aktin-Zytoskelett vermittelten Mechanismus zu einer gestörten Lokalisation von verschiedenen barrierebildenden TJ-Proteine führt, welche wiederum die Integrität der epithelialen Barriere beeinträchtigen. Die untersuchte Schädigung der epithelialen Barriere und die Öffnung des parazellulären Durchtrittsweges für Makromoleküle und die großen *C. difficile*-Toxine TcdA und TcdB stellt einen relevanten Pathomechanismus bei einer Infektion mit hypervirulenten *C. difficile*-Stämmen dar und liefert einen Erklärungsansatz für die Hypervirulenz von CDT-produzierenden *C. difficile*-Stämmen.

## Literaturverzeichnis

- Abdrabou, A. M. M., Ul Habib Bajwa, Z., Halfmann, A., Mellmann, A., Nimmesgern, A., Margardt, L., Bischoff, M., von Müller, L., Gärtner, B., & Berger, F. K. (2021). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in Germany, 2014–2019. *International Journal of Medical Microbiology*, *311*(4), 151507. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151507>
- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: Pathogenesis and host defence. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 609–620). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>
- Aktories, K., Schwan, C., & Jank, T. (2017). *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu. Rev. Microbiol*, *71*, 281–307. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816>
- Anwar, F., Roxas, B. A. P., Shehab, K. W., Ampel, N. M., Viswanathan, V. K., & Vedantam, G. (2022). Low-toxin *Clostridioides difficile* RT027 strains exhibit robust virulence. *Emerging Microbes & Infections*, *11*(1), 1982–1993. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2105260>
- Ayala-torres, C., Krug, S. M., Rosenthal, R., & Fromm, M. (2021). Angulin-1 (LSR) affects paracellular water transport, however only in tight epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22157827>
- Beer, L. A., Tatge, H., Schneider, C., Ruschig, M., Hust, M., Barton, J., Thiemann, S., Fühner, V., Russo, G., & Gerhard, R. (2018). The binary toxin CDT of *Clostridium difficile* as a tool for intracellular delivery of bacterial glucosyltransferase domains. *Toxins*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060225>
- Bücker, R., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Fromm, A., Zeitz, M., Chakraborty, T., Fromm, M., Epple, 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*(8), 1283–1292. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir504>
- Camilleri, M. (2019). Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*, *68*(8), 1516–1526. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318427>
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2013). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, *5*(1), 15–27. <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>

- Geric, B., Carman, R. J., Rupnik, M., Genheimer, C. W., Sambol, S. P., Lyerly, D. M., Gerding, D. N., & Johnson, S. (2006). Binary Toxin-Producing, Large Clostridial Toxin-Negative *Clostridium difficile* Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. In *Binary Toxin • JID*. <https://academic.oup.com/jid/article/193/8/1143/975200>
- Guery, B., Galperine, T., & Barbut, F. (2019). *Clostridioides difficile*: Diagnosis and treatments. In *The BMJ* (Vol. 366). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4609>
- Gülke, I., Pfeifer, G., Liese, J., Fritz, M., Hofmann, F., Aktories, K., & Barth, H. (2001). Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity*, 69(10), 6004–6011. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6004-6011.2001>
- Günzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology*, 2(3), 1819–1852. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110045>
- Heils, L., Schneemann, M., Gerhard, R., Schulzke, J. D., & Bücker, R. (2023). CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010054>
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A., Burgel, N., & Fromm, M. (2005). Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution. *Gastroenterology*, 129(2), 550–564. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.002>
- Hemmasi, S., Czulkies, B. A., Schorch, B., Veit, A., Aktories, K., & Papatheodorou, P. (2015). Interaction of the *Clostridium difficile* binary toxin CDT and its host cell receptor, lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR). *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 14031–14044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650523>
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S., & Mostov, K. E. (2008). Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4687–4693. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Jin, Y., & Blikslager, A. T. (2020). The regulation of intestinal mucosal barrier by myosin light chain Kinase/Rho kinases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21103550>



- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1516*(1), 188–196. <https://doi.org/10.1111/nyas.14870>
- Kordus, S. L., Thomas, A. K., & Lacy, D. B. (2022). Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>
- Krug, S. M. (2017). Contribution of the tricellular tight junction to paracellular permeability in leaky and tight epithelia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 219–230. <https://doi.org/10.1111/nyas.13379>
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Gü, D., Westphal, J. K., Huber, O., Jö, ‡, Schulzke, D., & Fromm, M. (2009). Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Molecular Biology of the Cell*, *20*, 3713–3724. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Krug, S. M., Bojarski, C., Fromm, A., Lee, I. M., Dames, P., Richter, J. F., Turner, J. R., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2018). Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor  $\alpha 2$ , affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. *Mucosal Immunology*, *11*(2), 345–356. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.52>
- Krug, S. M., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2014). Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *36*, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.002>
- Landenberger, M., Nieland, J., Roeder, M., Nørgaard, K., Papatheodorou, P., Ernst, K., & Barth, H. (2021). The cytotoxic effect of Clostridioides difficile pore-forming toxin CDTb. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1863*(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183603>
- Lobo de Sá, F. D., Butkevych, E., Natthamilarasu, P. K., Fromm, A., Mousavi, S., Moos, V., Golz, J. C., Stingl, K., Kittler, S., Seinige, D., Kehrenberg, C., Heimesaat, M. M., Bereswill, S., Schulzke, J.-D., & Bücker, R. (2019). Curcumin Mitigates Immune-Induced Epithelial Barrier Dysfunction by Campylobacter jejuni. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(19), 4830. <https://doi.org/10.3390/ijms20194830>
- López-Cárdenas, S., Torres-Martos, E., Mora-Delgado, J., Sánchez-Calvo, J. M., Santos-Peña, M., Zapata López, Á., Dolores López-Prieto, M., Pérez-Cortés, S., & Carlos Alados, J. (2021). The prognostic value of toxin B and binary toxin in Clostridioides

- difficile infection. In *Gut Microbes* (Vol. 13, Issue 1). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1884516>
- Lyon, S. A., Hutton, M. L., Rood, J. I., Cheung, J. K., & Lyras, D. (2016). CdtR Regulates TcdA and TcdB Production in *Clostridium difficile*. *PLoS Pathogens*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005758>
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., Ray, S. M., Thompson, D. L., Wilson, L. E., & Fridkin, S. K. (2014). Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1306801>
- Marquardt, I., Jakob, J., Scheibel, J., Hofmann, J. D., Klawonn, F., Neumann-Schaal, M., Gerhard, R., Bruder, D., & Jänsch, L. (2021). Clostridioides difficile Toxin CDT Induces Cytotoxic Responses in Human Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752549>
- Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., & Garza-González, E. (2022). An Update on Clostridioides difficile Binary Toxin. In *Toxins* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins14050305>
- Marujo, V., & Arvand, M. (2020). The largely unnoticed spread of Clostridioides difficile PCR ribotype 027 in Germany after 2010. *Infection Prevention in Practice*, 2(4), 100102. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100102>
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., & Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 124(4), 548–555. <https://doi.org/10.1242/jcs.072058>
- Nibbering, B., Gerding, D. N., Kuijper, E. J., Zwitterink, R. D., & Smits, W. K. (2021). Host Immune Responses to Clostridioides difficile: Toxins and Beyond. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.804949>
- Nusrat, A., Von Eichel-Streiber, C., Turner, J. R., Verkade, P., Madara, J. L., & Parkos, C. A. (2001). Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infection and Immunity*, 69(3), 1329–1336. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1329-1336.2001>
- Owens, S. E., Graham, W. V., Siccardi, D., Turner, J. R., & Mrsny, R. J. (2005). A strategy to identify stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase.

- Pharmaceutical Research*, 22(5), 703–709. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-2584-9>
- Papatheodorou, P., Carette, J. E., Bell, G. W., Schwan, C., Guttenberg, G., Brummelkamp, T. R., & Aktories, K. (2011). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16422–16427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109772108>
- Payne, A. M., Zorman, J., Horton, M., Dubey, S., Ter Meulen, J., & Vora, K. A. (2013). Caspase activation as a versatile assay platform for detection of cytotoxic bacterial toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2970–2976. <https://doi.org/10.1128/JCM.01161-13>
- Planche, T. D., Davies, K. A., Coen, P. G., Finney, J. M., Monahan, I. M., Morris, K. A., O'Connor, L., Oakley, S. J., Pope, C. F., Wren, M. W., Shetty, N. P., Crook, D. W., & Wilcox, M. H. (2013). Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: A prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(11), 936–945. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70200-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70200-7)
- Schulz, E., Schumann, M., Schneemann, M., Dony, V., Fromm, A., Nagel, O., Schulzke, J. D., & Bücker, R. (2021). *Escherichia coli* alpha-hemolysin hly<sub>A</sub> induces host cell polarity changes, epithelial barrier dysfunction and cell detachment in human colon carcinoma caco-2 cell model via pten-dependent dysregulation of cell junctions. *Toxins*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080520>
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., Van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W. D., Wehland, J., & Aktories, K. (2009). *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000626>
- Shashikanth, N., France, M. M., Xiao, R., Haest, X., Rizzo, H. E., Yeste, J., Reiner, J., & Turner, J. R. (2022). Tight junction channel regulation by interclaudin interference. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31587-8>
- Sheedlo, M. J., Anderson, D. M., Thomas, A. K., & Lacy, D. B. (2020). Structural elucidation of the *Clostridioides difficile* transferase toxin reveals a single-site binding mode for the enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), 6139–6144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920555117>

- Stieglitz, F., Gerhard, R., & Pich, A. (2021). The Binary Toxin of *Clostridioides difficile* Alters the Proteome and Phosphoproteome of HEp-2 Cells. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725612>
- Vicidomini, G., Bianchini, P., & Diaspro, A. (2018). STED super-resolved microscopy. *Nature Methods*, 15(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>
- Young, M. K., Leslie, J. L., Madden, G. R., Lyerly, D. M., Carman, R. J., Lyerly, M. W., Stewart, D. B., Abhyankar, M. M., & Petri, W. A. (2022). Binary Toxin Expression by *Clostridioides difficile* Is Associated with Worse Disease. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(3). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac001>
- Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2006). Restoration of ENaC expression by glucocorticoid receptor transfection in human HT-29/B6 colon cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(4), 1065–1070. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.012>

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lucas Heils, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Auswirkungen des binären *Clostridioides difficile* Toxins CDT auf die epitheliale Barriere“ bzw. „The Effects of Binary *Clostridioides difficile* Toxin CDT on the Epithelial Barrier“ 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.“

Berlin, den 18.12.2023

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Lucas Heils hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Heils, L.**, Schneemann, M., Gerhard, R., Schulzke, J. D., & Bücker, R. (2023). CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010054> (IF 4,2)

Beitrag im Einzelnen:

Sämtliche in der Publikation 1 dargestellte Daten sind in Experimenten gewonnen worden, die Lucas Heils durchgeführt hat. Lucas Heils hat ein HT-29/B6-GR/MR-Zellmodell zur Untersuchung der Auswirkungen des binären *C. difficile*-Toxins CDT auf die epitheliale Barriere etabliert und die funktionelle Charakterisierung der epithelialen Barriere mittels TER-Messung und Untersuchung makromolekularer Fluxe vorgenommen. Zudem hat er die dargestellten Versuche zur Untersuchung von möglicher Zelltodinduktion und der Proteinexpression verschiedener Tight Junction-Proteine und die Inhibitionsversuche eigenständig durchgeführt. Auch die mikroskopische Untersuchung mit konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie und STED-Mikroskopie führte Lucas Heils eigenständig durch. Alle in dieser Arbeit gezeigten mikroskopischen Bilder sind durch Lucas Heils aufgenommen und für die Publikation vorbereitet worden.

Alle Abbildungen, also die Abbildungen 1 bis 11 zur Visualisierung der Daten sind durch Lucas Heils erstellt worden. Die nachfolgenden Prozentangaben stellen den prozentualen Anteil an den jeweiligen Arbeitsprozessen dar. Zudem hatte Lucas Heils einen Beitrag bei der Entwicklung des Konzepts der Arbeit (30%), bei der Auswahl und Etablierung der geeigneten Methodik (50%) und beim Schreiben des Manuskriptes der Publikation (50%).

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

## Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2022** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"TOXICOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 94 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
1	Annual Review of Pharmacology and Toxicology	8,724	12.5	0.00515
2	DRUGS	19,355	11.5	0.01735
3	ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES	44,887	10.4	0.01925
4	Particle and Fibre Toxicology	5,945	10.0	0.00367
5	JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART B-CRITICAL REVIEWS	2,313	7.2	0.00113
6	ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY	60,092	6.8	0.05215
7	ARCHIVES OF TOXICOLOGY	14,795	6.1	0.01097
8	CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY	2,915	6.1	0.00215
9	Reviews of Environmental Contamination and Toxicology	3,028	6.0	0.00097
10	CRITICAL REVIEWS IN TOXICOLOGY	4,719	5.9	0.00224
11	INFLAMMOPHARMACOLOGY	4,600	5.8	0.00382
12	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,737	5.3	0.00199
13	CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS	17,189	5.1	0.00901
14	Nanotoxicology	5,327	5.0	0.00290
15	Toxics	4,146	4.6	0.00409
16	AQUATIC TOXICOLOGY	18,361	4.5	0.00959
17	ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY	7,286	4.5	0.00427
18	Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology	6,073	4.5	0.00570
19	TOXICOLOGY	15,236	4.5	0.00644

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfaktor
20	Environmental Toxicology and Pharmacology	10,445	4.3	0.00579
21	Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology	5,089	4.3	0.00376
22	FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY	40,463	4.3	0.01984
23	DRUG SAFETY	6,838	4.2	0.00532
24	Toxins	22,084	4.2	0.02147
25	CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY	14,319	4.1	0.00740
26	ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY	21,979	4.1	0.00923
27	ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY	8,178	4.0	0.00279
28	COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C-TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY	8,223	3.9	0.00386
29	DNA REPAIR	6,707	3.8	0.00765
30	TOXICOLOGICAL SCIENCES	18,287	3.8	0.00886
31	TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY	20,884	3.8	0.00884
32	JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR TOXICOLOGY	4,931	3.6	0.00385
33	TOXICOLOGY LETTERS	16,628	3.5	0.00765
34	NEUROTOXICOLOGY	8,132	3.4	0.00464
35	REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY	10,157	3.4	0.00606
36	CLINICAL TOXICOLOGY	4,999	3.3	0.00523
37	Environmental Pollutants and Bioavailability	356	3.3	0.00037
38	IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY	2,770	3.3	0.00146
39	JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY	6,812	3.3	0.00383



## Druckexemplar der Publikation



Article

# CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers

Lucas Heils <sup>1</sup>, Martina Schneemann <sup>1</sup>, Ralf Gerhard <sup>2</sup>, Jörg-Dieter Schulzke <sup>1</sup> and Roland Bücker <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Clinical Physiology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, 12203 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Institute of Toxicology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

\* Correspondence: roland-felix.buecker@charite.de

**Abstract:** Background: *Clostridioides difficile* binary toxin (CDT) defines the hypervirulence of strains in nosocomial antibiotic-induced colitis with the highest mortality. The objective of our study was to investigate the impact of CDT on the intestinal epithelial barrier and to enlighten the underlying molecular mechanisms. Methods: Functional measurements of epithelial barrier function by macromolecular permeability and electrophysiology were performed in human intestinal HT-29/B6 cell monolayers. Molecular analysis of the spatial distribution of tight junction protein and cytoskeleton was performed by super-resolution STED microscopy. Results: Sublethal concentrations of CDT-induced barrier dysfunction with decreased TER and increased permeability for 332 Da fluorescein and 4 kDa FITC-dextran. The molecular correlate to the functional barrier defect by CDT was found to be a tight junction protein subcellular redistribution with tricellulin, occludin, and claudin-4 off the tight junction domain. This redistribution was shown to be MLCK-dependent. Conclusions: CDT compromised epithelial barrier function in a human intestinal colonic cell model, even in sublethal concentrations, pointing to barrier dysfunction in the intestine and leak flux induction as a diarrheal mechanism. However, this cannot be attributed to the appearance of apoptosis and necrosis, but rather to an opening of the paracellular leak pathway as the result of epithelial tight junction alterations.

**Keywords:** binary toxin; tight junction; barrier function; claudin; tricellulin; occludin; cytoskeleton; actin; leak flux; STED microscopy

**Key Contribution:** CDT impairs intestinal epithelial barrier function already in sublytic concentrations by subcellular delocalization of tight junction proteins, such as claudin-4 and tricellulin, via activation of cytoskeletal actomyosin by the MLCK.



**Citation:** Heils, L.; Schneemann, M.; Gerhard, R.; Schulzke, J.-D.; Bücker, R. CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers. *Toxins* **2023**, *15*, 54. <https://doi.org/10.3390/toxins15010054>

Received: 14 December 2022

Revised: 4 January 2023

Accepted: 5 January 2023

Published: 7 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) is a Gram-positive, sporulating, and anaerobic bacterium and a frequent cause of nosocomial infections [1,2]. *C. difficile* infection is the most common cause of antibiotic-associated colitis. The patients present with severe diarrhea, potential development of pseudomembranous colitis, and the formation of toxic megacolon [3]. The main virulence factors produced by *C. difficile* are the glycosylating toxins TcdA and TcdB, and additionally in hypervirulent *C. difficile* strains, the ADP-ribosylating toxin CDT. The presence of this CDT toxin is associated with increased lethality, indicating additive pathomechanisms. Thus, the presence of the binary toxin increases the risk for severe disease progression, complications, recurrence of infection, and mortality [4,5]. The underlying mechanisms of hypervirulence remain unclear. CDT belongs to the family of binary toxins with two subunits: CDTa and CDTb. CDTb uses LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, syn. angulin-1) for receptor binding to the host cell and mediates the cellular uptake of CDTa [6]. Internalized CDTa causes the ADP-ribosylation of G-actin,

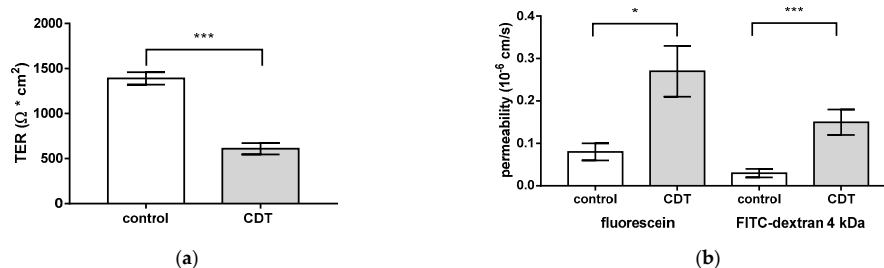
thereby inhibiting the polymerization of F-actin [7]. CDT has been shown to induce cell rounding, loss of cell viability, and microtubule redistribution [8]. Moreover, CDT affects the proteome and, in particular, the phosphorylation status of cellular proteins, including increased phosphorylation of calmodulin kinase motifs, which contributes to the regulation of myosin light chain (MLC) and MLC kinase (MLCK) activity [9,10]. The cytoskeletal integrity is decisive for intestinal epithelial barrier function via regulation of tight junction (TJ) proteins and is supposed to be targeted by CDT during *C. difficile* infection. The intestinal TJ in man consists of 26 claudins, occludin, tricellulin, and further accessory TJ proteins maintaining the barrier function in different intestinal segments, depending on their composition of claudins with barrier-forming or pore-forming properties. The action of *C. difficile* toxins on barrier function was originally shown with respect to occludin, but not for barrier-forming claudins [11] or the tricellular TJ (tTJ), the latter of which provides, if disrupted, a pathway for macromolecules through the epithelial barrier [12,13]. Changes in the subcellular distribution of intestinal TJ proteins can cause diarrhea by a leak flux mechanism and a paracellular loss of solutes and water into the lumen. Furthermore, this TJ redistribution can induce the leaky gut phenomenon, the paracellular uptake of luminal antigens with the consequence of an immune-mediated self-enforcing barrier disruption [14,15].

Thus, the aim of the present study was to identify the epithelial barrier pathology with regard to TJ alterations in intestinal epithelial cells in response to CDT and to enlighten the inherent molecular pathomechanisms for a better understanding of its pathology in the human colon.

## 2. Results

### 2.1. CDT Impairs Epithelial Barrier Integrity of HT-29/B6 Monolayers

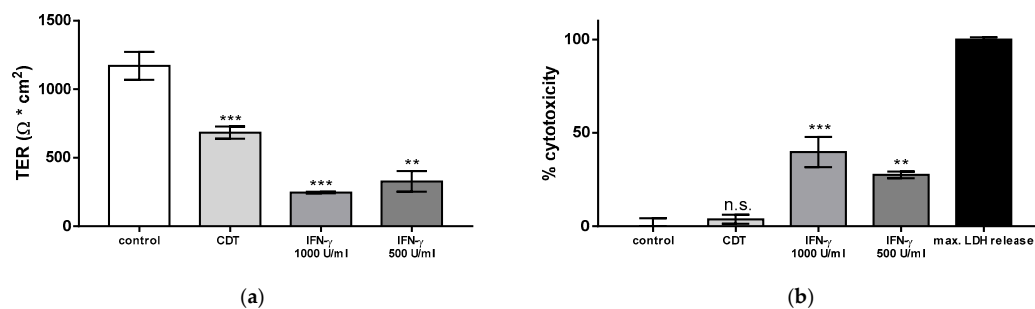
In order to investigate the impact of CDT on the epithelial barrier, human colon carcinoma HT-29/B6 cell monolayers [16] were treated with 5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb. After 24 h, the transepithelial electrical resistance (TER) in CDT-treated monolayers was reduced by half compared to control monolayers, indicating impaired integrity of the paracellular pathway (Figure 1a). Concomitantly, treatment with CDT tripled the paracellular permeability for the macromolecule marker fluorescein (332 Da) and increased the permeability for fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (4 kDa) by a factor of 5.5 (Figure 1b). Treatment with the individual subunits of CDT in a concentration of 5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb resulted in an unchanged TER after 24 h. With a higher concentration of 3000 ng/mL, CDTb reduced the TER ( $41 \pm 9\%$  of initial TER after 24 h,  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ), whereas CDTa had no effect on TER ( $102 \pm 2\%$  of initial TER value after 24 h, n.s.,  $n = 3$ ).



**Figure 1.** Epithelial barrier function in human HT-29/B6 epithelial cell monolayers 24 h after *Clostridioides difficile* binary toxin (CDT) treatment. (a) Functional characterization of the effect of CDT on the intestinal epithelial cells with measurements of transepithelial electrical resistance (TER) and (b) macromolecular fluxes of the paracellular markers 332 Da fluorescein and 4 kDa FITC-dextran. CDT was applied from the apical side with a concentration of 5 ng/mL CDTa together with 10 ng/mL CDTb. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's *t*-test,  $n = 5$ .

### 2.2. Necrosis Induction and the Rate of Apoptotic Epithelial Cells Are Unchanged after Treatment with Sublethal Concentrations of CDT

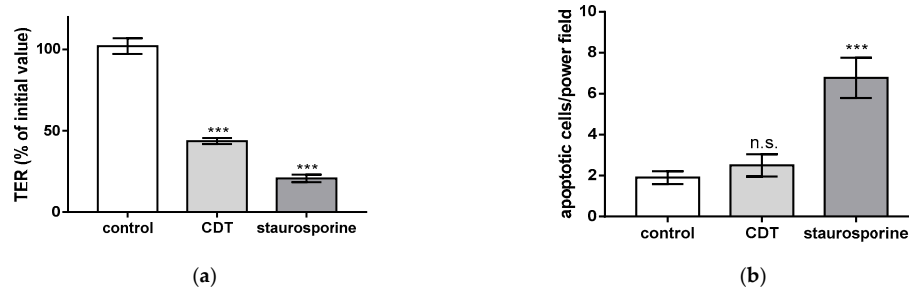
Next, the contribution of cytotoxicity to CDT-induced epithelial barrier defect was examined. As a positive control of cytotoxicity, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) as an inducer of necrosis was applied to the cell monolayers, in order to analyze the effect of cell loss in the monolayers on barrier dysfunction (Figure 2). In CDT-treated cell monolayers, no correlation was found between barrier dysfunction and cytotoxicity, since sublethal CDT concentration as used here did not induce necrosis. Thus, barrier-relevant epithelial cell death was not increased by CDT treatment. In contrast, as a positive control, IFN- $\gamma$ -treated cells showed an increased LDH release, indicating the induction of barrier-relevant necrosis. Furthermore, in parallel experiments with sublethal CDT concentrations, there was also no evidence for the induction of apoptosis. In contrast, staurosporin, as a positive control for apoptosis induction reduced TER, accompanied by epithelial cell death (Figure 3). In line with this observation, disinhibition experiments with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (10  $\mu$ M) failed to ameliorate the barrier dysfunction induced by CDT ( $46 \pm 2\%$  of the initial TER in CDT-treated monolayers versus  $44 \pm 2\%$  in CDT plus Q-VD-OPh-treated monolayers, n.s.,  $p = 0.41$ , Student's  $t$ -test,  $n = 5$ ). Thus, the barrier defect of sublethal CDT concentrations has to be attributed to paracellular TJ effects and not to cell death phenomena.



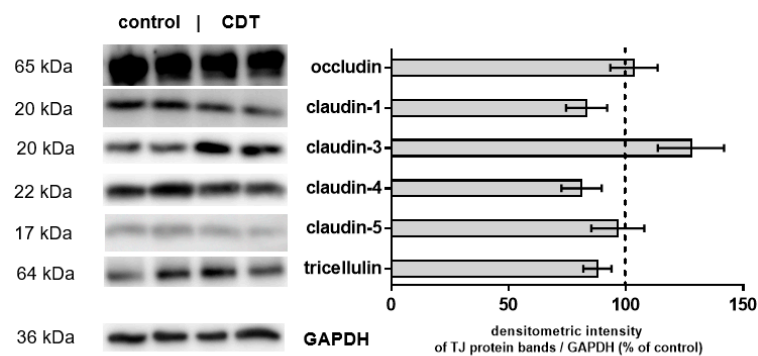
**Figure 2.** Barrier function and cytotoxicity in HT-29/B6 intestinal cell monolayers. (a) Transepithelial electrical resistance (TER) in epithelial cell monolayers after 24 h of treatment with CDT from the apical side with a concentration of 5 ng/mL. In these experiments, 5 ng/mL CDTa was applied together with 10 ng/mL CDTb. In parallel experiments, treatment with 500 and 1000 U/mL interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) as a positive control for induction of necrosis decreased TER after 72 h. (b) A lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to assess necrotic cell death. The negative control monolayers remained untreated. The positive control monolayers with maximum LDH release and 100% necrosis induction were treated with a detergent lysis buffer. n.s. = not significant, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , one-way ANOVA with Bonferroni correction,  $n = 3-5$ .

### 2.3. Tight Junction Protein Expression after 24 h of Low-Dose CDT Treatment in HT-29/B6 Monolayers

Another reason for the functional impairment of the epithelial barrier could be the downregulation of barrier-forming TJ proteins. The densitometric analysis of Western blots of the TJ proteins occludin, tricellulin, and claudin-1, -3, -4, -5 from HT-29/B6 monolayers 24 h after treatment with CDT revealed no change in protein expression (Figure 4).



**Figure 3.** Barrier function and apoptotic cell death rate in HT-29/B6 cell monolayers. (a) Transepithelial electrical resistance (TER) in epithelial cell monolayers after 24 h of treatment with CDT from the apical side (5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb) or after 24 h of treatment with 1  $\mu$ M staurosporine. (b) A terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used to visualize fragmented target cell DNA as a sign of apoptosis induction. TUNEL-positive cells were counted microscopically. Cell death induction was expressed as TUNEL-positive cells after CDT or staurosporine treatment. n.s. = not significant, \*\*\*  $p < 0.001$ , one-way ANOVA with Bonferroni adjustment,  $n = 5-10$ .

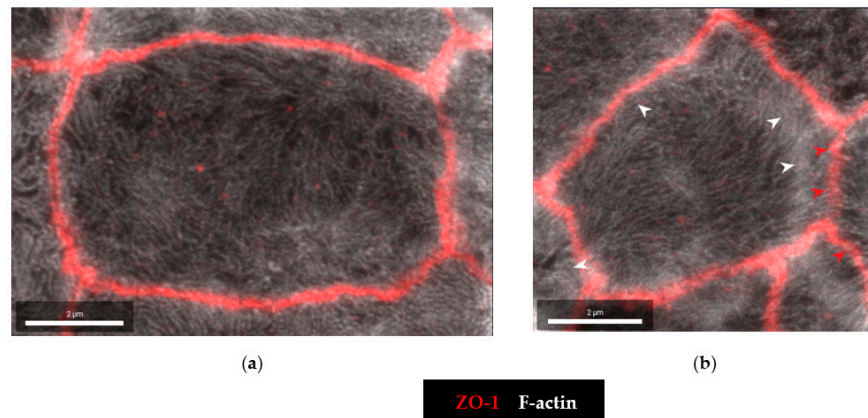


**Figure 4.** Expression of tight junction proteins in CDT-treated HT-29/B6 monolayers. Western blot was performed on the cell lysates 24 h after exposure to CDT. This representative Western blot shows two lanes of each condition. The expression level of tight junction proteins was normalized with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Immunoblots were analyzed by densitometry and normalized to the level of GAPDH as a loading control. The dashed line represents the control value set to 100%. The values were not different from controls.  $n = 4-6$  and Student's  $t$ -test with Bonferroni adjustment was used for multiple comparisons.

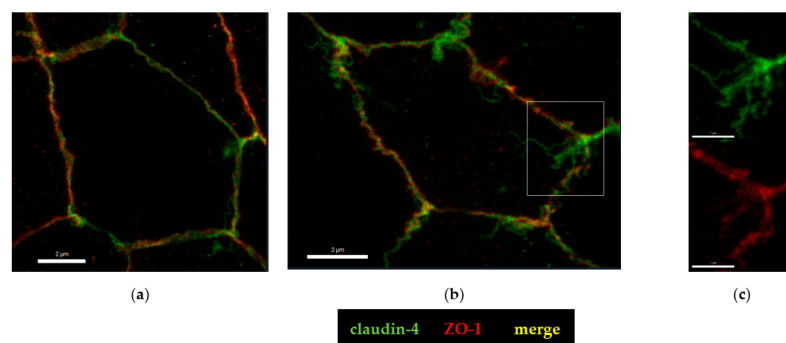
#### 2.4. Microstructural Analysis by Super-Resolution Microscopy of CDT Impact on the Tight Junction

To further analyze the molecular correlate to the functional barrier defect after CDT treatment, we analyzed our HT-29/B6 cell monolayers by super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy. In untreated controls, the shape of the TJ, here represented by zonula occludens protein-1 (ZO-1), appears smooth, without any discontinuities or ruffling and the cytoskeletal F-actin pattern shows an even distribution of filaments around the perijunctional ring (Figure 5a). In the CDT-treated cells, ruffling of ZO-1 and perijunctional condensation of F-actin around the TJs were observed, without any obvious changes in the F-actin signals throughout the cell, reflecting an intact cytoskeletal organization (Figure 5b). As one abundant representative of the barrier-forming claudin family, claudin-4 was analyzed in more detail in super-resolution images and was found to

be frayed and pulled out of the TJ (Figure 6), and was redistributed into mesh-like strand formations at lateral membranes and the tricellular TJ domain. This kind of fraying of TJ proteins was seen in the bicellular TJ but was also prominent in the tricellular TJ domain (Figure 6b,c).



**Figure 5.** Super-resolution STED microscopy of confluent human HT-29/B6 cells. Microscopic signals of Zonula occludens protein-1 (ZO-1) are shown in red by immunofluorescent staining. F-actin is shown in white by fluorescent phalloidin staining. (a) Untreated control cell. (b) CDT-treated cell 24 h after exposure to 5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb. White arrowheads indicate perijunctional condensation of F-actin and red arrowheads indicate the onset of TJ ruffling. Bar = 2  $\mu$ m.

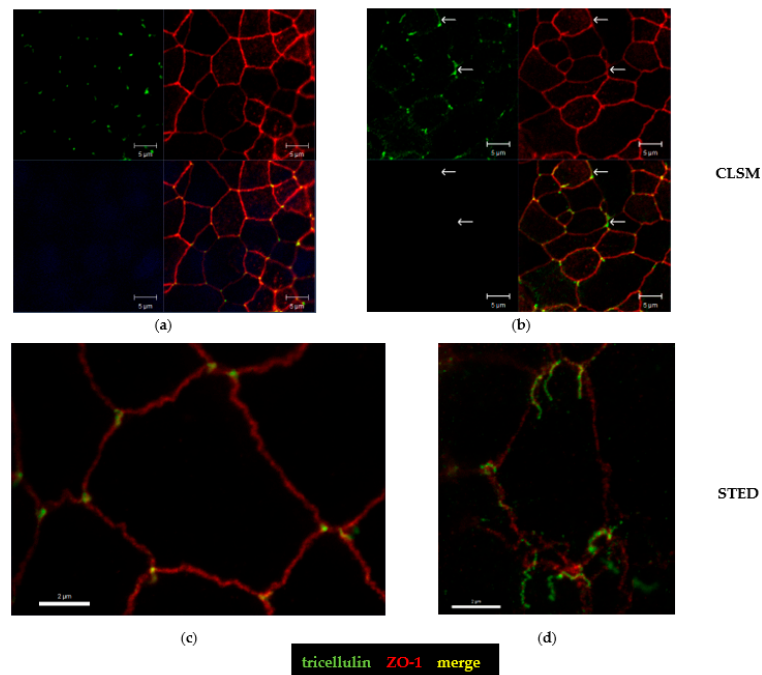


**Figure 6.** Super-resolution analysis of tight junction proteins with STED microscopy. Immunofluorescence staining colored claudin-4 are green and Zonula occludens protein-1 (ZO-1) are red. (a) As a control, untreated HT-29/B6 epithelial cell monolayers were used; bar = 2  $\mu$ m. (b) CDT-treated monolayers after 24 h; bar = 2  $\mu$ m. (c) CDT-treated monolayers and detail of tricellular tight junction, which is enlarged from the white square in image b; bar = 1  $\mu$ m.

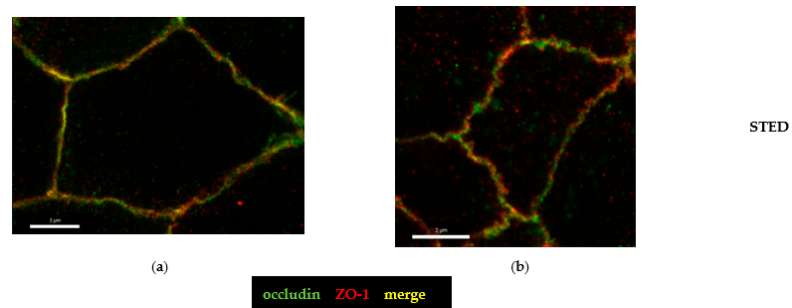
### 2.5. Tricellular Tight Junction Delocalization in CDT-Treated Epithelial Cells

The hint for an involvement of the tricellular tight junction (tTJ) arose from the analysis of claudin-4 staining (Figure 6) and pushed our study toward a more detailed characterization of the tTJ. Immunostainings of CDT-treated HT-29/B6 monolayers revealed already in conventional confocal laser-scanning microscopy (CLSM, Figure 7a,b) a subcellular redistribution of the tTJ protein tricellulin into the bicellular tight junction (bTJ) and to a smaller extent of the TJ domain into intracellular compartments (Figure 7b). Using the higher resolution of STED microscopy, the details of tricellulin redistribution became clearer. In

controls, tricellulin was localized with sharp punctated signals at the tTJ (Figure 7c). After CDT treatment, the boundary of tricellulin signaling was no longer sharp and resembled a lining up of tricellulin proteins along the bicellular tight junction with loss of exclusive tricellular localization (Figure 7d), and thus could be responsible for a loss of epithelial barrier function through the tTJ for small macromolecules, such as fluorescein and 4 kDa dextran (Figure 1b). Since occludin, as one member of the tight junction-associated MARVEL protein family (TAMPs), is closely related to tricellulin, which both share the barrier function for the prevention of macromolecular influx [17], we investigated the spatial distribution of occludin in CDT-treated cell monolayers (Figure 8). In STED micrographs, another microstructural pathology of CDT became visible in the bTJ, namely the occludin signal that was ruffled compared to the smooth TJ in the control cell monolayers (Figure 8a,b).



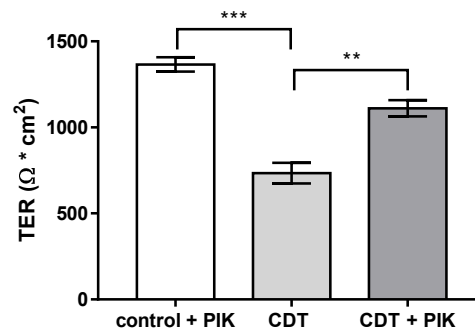
**Figure 7.** Confocal microscopy and STED microscopy reveal subcellular tricellulin redistribution. The subcellular distribution of the tricellular tight junction protein tricellulin is changed after CDT treatment. Using immunofluorescence staining, colored tricellulin appears green and ZO-1 red. Nuclei are colored blue with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). (a) Conventional confocal laser-scanning microscopy (CLSM) of an untreated control monolayer of human HT-29/B6 epithelial cells; green = tricellulin, red = ZO-1, blue/black = the fluorescence channel for showing the absence of cell nuclei at this cell level, yellow = a merge of green and red. (b) CLSM of tricellulin, which is redistributed off the tricellular tight junction domain in CDT-treated cell monolayers. White arrows indicate tricellulin redistribution from tricellular to bicellular TJs; bar = 5  $\mu\text{m}$ . (c) STED microscopy of an untreated control cell. (d) STED micrograph of a CDT-treated cell; bar = 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8.** Confocal microscopy and STED microscopy of occludin changes. Occludin is colored green and ZO-1 is colored red by immunofluorescence staining. (a) STED microscopy of an untreated control. (b) STED of a CDT-treated cell. Occludin signal appears ruffled along the bicellular tight junction domain; bar = 2  $\mu\text{m}$ .

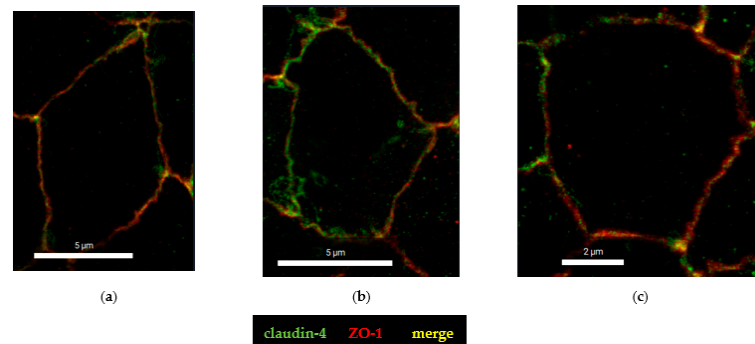
#### 2.6. Disinhibition of the Barrier Defect of CDT by Specific Myosin Light-Chain Kinase Inhibitor PIK

CDT has been shown to destabilize the actin cytoskeleton, leading to cell death at high concentrations, but in addition, it is able to alter the proteome and the phospho-status of CDT-intoxicated cells [9]. Since we observed ruffling of TJ proteins (Figures 5, 6 and 8) in CDT-treated cells with sublethal concentrations, which indicates a tension of the TJ-connected perijunctional cytoskeleton, we aimed to interfere experimentally with the suspected actin–myosin constriction as a regulator of TJ proteins. Such a regulatory mechanism has already been reported before to be responsible for TJ protein redistribution and barrier function changes in other pathologies [18,19]. Using an inhibitor for the MLCK, the pseudosubstrate PIK, which specifically blocks MLC phosphorylation by the MLCK [20], we could show that the barrier-opening effect of CDT was ameliorated by PIK (Figure 9). Moreover, we could visualize this functional recovery of barrier function at the molecular level by STED microscopy addressing the barrier-forming claudin-4 (Figure 10). PIK restored both the smooth ZO-1 profile and the claudin-4 distribution (Figure 10c).



**Figure 9.** Recovery of the barrier defect induced by CDT (5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb) with 200  $\mu\text{M}$  D-reverse PIK (PIK), a specific MLCK inhibitor [20]. Transepithelial electrical resistance (TER) was measured in HT-29/B6 cell monolayers 24 h after treatment. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 5$ , Student's  $t$ -test with Bonferroni correction.

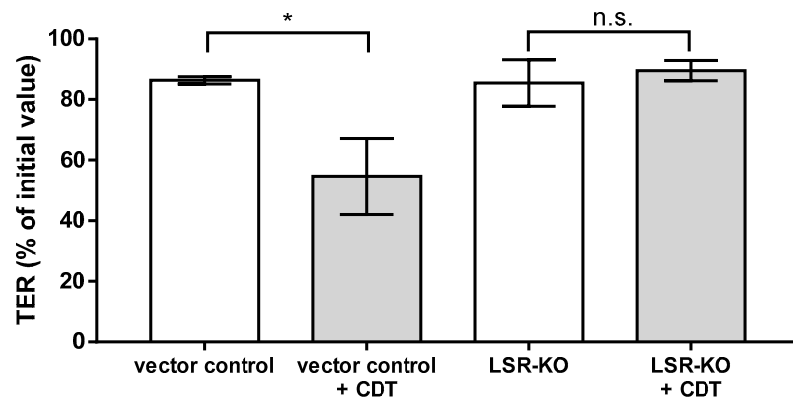




**Figure 10.** Recovery of paracellular integrity of claudin-4 after CDT treatment and protective treatment with 200  $\mu\text{M}$  D-reverse PIK (PIK). Immunostainings of claudin-4 (green) and ZO-1 (red) in HT-29/B6 cell monolayers after 24 h of treatment, visualized by super-resolution STED microscopy. (a) Untreated control; bar = 5  $\mu\text{m}$ . (b) CDT treatment; bar = 5  $\mu\text{m}$ . (c) Treatment of CDT and PIK; bar = 2  $\mu\text{m}$ .

### 2.7. Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR) Dependence of Barrier Defect of CDT

LSR has been shown to be the receptor facilitating the cellular uptake of CDT [20]. Using HT-29/B6 cell monolayers with an LSR knockout, we were able to show that the presence of LSR is required for the induction of a barrier defect by CDT. In the LSR knockout cells, CDT in a sublethal concentration had no effect on the TER (Figure 11).



**Figure 11.** LSR dependence of the barrier defect induced by CDT (5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb) in human HT-29/B6-LSR knockout (LSR-KO) cell monolayers versus vector control monolayers. Transepithelial electrical resistance (TER) was measured 24 h after treatment. \*  $p < 0.05$ , n.s. = not significant.  $n = 3$ , Student's  $t$ -test.

### 3. Discussion

The major virulence factors of *C. difficile* are the large glycosylating toxins TcdA and TcdB. However, a significant proportion of *C. difficile* infection strains (5–30%), such as RT027, additionally produce the binary toxin CDT. With its subunits CDTa and CDTb [21], it resembles other bacterial toxins from the binary toxin family, such as *Clostridium perfringens* iota toxin or the *C. botulinum* C2 toxin [22]. In high concentrations, CDT exhibits relevant cytotoxicity, leading to depolymerization of the actin cytoskeleton and rounding of cells [7,23], as well as induction of apoptosis [24]. In contrast, in sublytic concentra-



tions, neither cytotoxic nor cytopathic effects were observed. Instead, we observed a slow weakening of the epithelial barrier over several hours, functionally reflected in a decrease in TER and an increase in the permeability of small macromolecules. We used low (sublytic) concentrations because antibiotic-dependent *C. difficile*-positive diarrhea is not regularly associated with severe pseudomembranous colitis, but often only with low-grade inflammatory responses of the colonic mucosa, which we wanted to study with this experimental design.

Protein expression levels of TJ proteins claudin-1, -3, -4, -5, occludin, and tricellulin, as obtained from Western blots, were unchanged in our HT-29/B6 cell culture model after exposure to sublytic CDT concentrations over 24 h. However, the localization of claudin-4 in the TJ domain of the cells was changed after CDT treatment, visualized by super-resolution microscopy. Claudin-4 was used for this analysis since it is one of the most abundant TJ proteins in the bTJ of the intestine and it has a barrier-maintaining function, i.e., it seals the TJ strands, as indicated by TER and paracellular flux measurements [25]. Furthermore, claudin-4 stands also as a representative for other barrier-forming proteins of the claudin family. Indeed, the altered appearance of claudin-4 gave us the first clue to the molecular correlate of the change in barrier function induced by CDT. Claudin-4 appeared frayed and was pulled out of the TJ and redistributed into mesh-like strand formations at lateral membranes and the tricellular TJ. Fraying may be due to impacts of force emanating from the cytoskeleton, finally leading to subcellular protein redistribution.

However, the most-studied TJ protein regarding barrier function is occludin. Its barrier properties have been rather assigned to the limitation of macromolecule translocation than to ion permeation. This could, e.g., be achieved by stabilizing the localization of other proteins as tricellulin in the tTJ domain of the cells during the highly dynamic process of assembly and disassembly of TJ proteins in the plasma membrane [26]. Thus, the changes in occludin expression in some of the cells of the monolayers observed after CDT treatment could indeed increase macromolecule permeability in the tTJ along this protein distribution dynamics. This contributes to the influx of macromolecules acting as antigens from the intestinal lumen into the mucosa, which is discussed as the leaky gut phenomenon during intestinal inflammation [27,28].

Even more direct evidence for the source of the epithelial barrier defect to macromolecules after CDT treatment comes from our data on tricellulin, which was redistributed off of the tTJ toward the bTJ or into intracellular compartments with a loss of a sharp and exclusive restriction to the tTJ. The consequence is an overall weakening of the epithelial barrier function against luminal macromolecules and antigens [29]. This phenomenon can be interpreted as an additional mechanism in the pathology of hypervirulent *C. difficile* strains, thereby enabling the access of other bacterial toxins, such as the large toxins TcdA and TcdB. Another mechanism of hypervirulence would be an altered toxin expression and regulation in CDT-positive strains [30], even if we have demonstrated in our present study that CDT can induce epithelial barrier dysfunction even at very low and sublethal toxin concentrations. Thus, we hypothesize that the CDT-dependent facilitated access of TcdA and TcdB to the basolaterally localized receptors Frizzled and CSPG4 is the more relevant role of CDT [31,32]. In contrast to toxins TcdA and TcdB, the receptors of which are localized basolaterally on enterocytes, LSR (syn. angulin-1), the receptor for CDT [33], has an apical localization at the tTJ [34]. This mutual opening of the epithelial barrier by toxins with different receptor localization might indeed be a novel explanation for additive toxin effects and the pronounced severity of infection with CDT-positive strains, although this hypothesis requires further experimental confirmation in the future.

Furthermore, as a consequence of these mutual toxin effects, one has to take into account the facilitated access of toxins to the mucosal subepithelial immune cells, as a result of which intestinal inflammatory processes are intensified along the leaky gut concept. It has been argued that such effects on mucosal immune cells in *C. difficile* infection lead to a more severe disease outcome [35,36]. Furthermore, it may be reasonable to conclude that the combined cytotoxicity of the different toxins in CDT-positive strains induces cell death

in the epithelial cell layer such as apoptosis, necrosis, necroptosis, or autophagy. Although clinical isolates of TcdA<sup>-</sup>/TcdB<sup>-</sup>/CDT<sup>+</sup> strains of *C. difficile* were described to be associated with specific, non-severe forms of CDI, the cytotoxic and pathogenic effect of CDT alone is still under discussion [37,38]. In this context, the ability of the pore-forming CDTb subunit to induce calcium influx into epithelial cells should be mentioned [23,39]. Calcium influx caused by other pore-forming toxins, such as AerA from *Aeromonas hydrophila* or HlyA from B2 *Escherichia coli*, can beyond cell death induction, mediate disruption of the intestinal TJ via activation of the MLCK [19,40].

The regulation of the MLCK depends on the intracellular calcium concentration. Higher calcium concentrations activate the MLCK [10]. This induces MLC phosphorylation and leads to constriction of the perijunctional actomyosin cytoskeleton (syn. cortical actin filaments), as a result of which accessory TJ proteins, such as ZO-1, but also strand-forming TJ proteins, such as claudins, occludin, and tricellulin, are sorted out of the TJ domain of the cell. Noteworthy, CDTb alone at sublethal concentrations of 10 ng/mL had no such effect on the TER in our intestinal cell culture model. Only higher concentrations affected TER by pore formation in the apical membrane.

However, there is another CDT-dependent regulatory input. CDT also alters the phosphorylation status of the host cells. It has been recently shown that the target sequences of the calmodulin kinase are more phosphorylated after CDT treatment in HEp-2 cells [9]. This has relevance for the regulation of the MLCK since the MLCK can be activated by phosphorylation, which is mediated by the calmodulin kinase [10]. Thus, subsequent regulatory inputs via MLC and the perijunctional actomyosin cytoskeleton on TJ regulation have to be assumed for CDT. Interestingly, this resembles toxin-dependent TJ regulation was recently observed for *Microcystis* spp., which produces a cyanotoxin and microcystin, and also acts on the epithelial TJ via MLC interference [18]. Additionally, in microcystin-dependent barrier regulation, the specific MLCK inhibitor PIK could mitigate the effects on the TJ. The same specific MLCK inhibitor D-reverse PIK, an amino acid chain and pseudosubstrate of the MLCK [20], was used in the present study for analyzing CDT. It turned out that PIK was also highly effective on CDT. PIK improved the CDT-induced barrier defect, as well as the claudin-4 dislocalization.

From the ruffling of the ZO-1 signal in the TJ together with an increased condensation of F-actin around the TJ observed already at sublethal CDT concentrations, it became obvious that the perijunctional cytoskeleton is the major target of the TJ disruption [41]. While the dysregulation of actin with ribosylation of G-actin by CDTa might be an important hit on the actin cytoskeleton, only the additional change in the phosphorylation status of the epithelial cells by CDTb might have this significant impact on barrier function at low toxin concentrations. Therefore, potential new therapeutic prospects for MLCK inhibition have been proposed for different indications [42], and may also be a target for hypervirulent *C. difficile* infection, which we propose to investigate in the future.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Culture

Human HT-29/B6-GR/MR colon carcinoma cells (a subclone of the HT-29/B6 cell line stably expressing human glucocorticoid  $\alpha$  and human mineralocorticoid-receptors, both cell lines were generated in our laboratory of the Clinical Physiology, Charité, Berlin, Germany) [16] were cultivated 25 cm<sup>2</sup> culture flasks (Corning, Glendale, AZ, USA) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) cell culture medium with GlutaMAX supplement (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) for 7 days at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. RPMI 1640 culture media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 300 µg/mL of G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 200 µg/mL of hygromycin B (Biochrom GmbH, Berlin, Germany). For experimental use, cells were seeded on polycarbonate filter supports (Millicell-PCF, effective membrane area 0.6 cm<sup>2</sup>, pore size 3 µm, Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Ger-

many) and grown to confluence. Experiments were performed 8–9 days after seeding. The medium was changed every 2 days. HT-29/B6 with a stable LSR knockout was created, as previously described by our group, using a sgRNA-CRISPR/ Cas9 vector [43]. These cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA), and 1.5 µg/mL of puromycin.

#### 4.2. Toxin Treatment and Functional Characterization of Epithelial Barrier Function

The two CDT subunits, CDTa and activated CDTb, were produced at the Institute of Toxicology, Hannover Medical School, Germany. They were generated, as previously described, using an *Escherichia coli* expression system [44]. Cells were treated with 5 ng/mL CDTa and 10 ng/mL CDTb. To determine epithelial barrier function, transepithelial electrical resistance (TER) was measured before and 24 h after CDT treatment. TER values were recorded with chop-stick electrodes and a Volt–Ohm meter (EVOM<sup>3</sup>; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) under sterile conditions. TER was subsequently corrected for the resistance of an empty filter and calculated assuming a growth area of 0.6 cm<sup>2</sup>. To further characterize the barrier integrity of cell monolayers, epithelial permeability measurements were performed. Thereby, fluorescent markers of different molecular size, fluorescein (332 Da; 100 µM), and FITC-dextran (4 kDa; 200 µM) were used. Fluxes were measured from apical to the basolateral compartment in 12-well plates at 37 °C. Samples were taken from the basolateral side every 15 min up to one hour for fluorescein flux measurements and every 30 min up to two hours for FITC-dextran. The fluorescence signals were measured spectrophotometrically (Tecan GmbH, Maennedorf, Switzerland). Permeability was then calculated as flux/concentration differences.

#### 4.3. Cytotoxicity Tests

To detect epithelial apoptosis in CDT-treated HT-29/B6 cell monolayers, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay (In situ Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany) was performed, according to the manufacturer's instructions. Nuclei were then stained by DAPI (1:1000; Roche AG, Basel, Switzerland). Apoptosis-positive cells were visualized using confocal laser-scanning microscopy (CLSM; Zeiss LSM780, Jena, Germany) and counted per low-power field of approximately 200 to 300 cells. The number of apoptotic events was estimated in three to four randomly picked regions per sample. The ratio of apoptosis was then calculated as the number of TUNEL-positive cells relative to the total number of cells. As a positive control, staurosporine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used. To induce apoptosis, a concentration of 1 µM of staurosporine was applied and cells were incubated for 24 h. In further experimental series, cellular cytotoxicity was determined by CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Cells of the control group lysed with the kit's 10× lysis buffer served as an internal positive control for the LDH assay, which equals the maximal LDH release possible. In addition, interferon gamma (IFNγ; 500 or 1000 U/mL) was used as a positive control of cytotoxicity induction and was added in the basolateral compartment for 72 h. Cytotoxicity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \left( \frac{\text{compound treated LDH activity} - \text{spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{spontaneous LDH activity}} \right) \times 100$$

#### 4.4. Western Blot Analysis

Differential expression of TJ proteins was investigated by Western blot analysis. Controls and CDT-treated cell monolayers were washed twice with PBS (Gibco, Life Technologies). Ice-cold whole cell lysis buffer (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)) was added, and cells were scraped from the filters. After 30 min of incubation on ice with

vortexing in between, cells were centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C, and the supernatant was collected. Protein concentration was estimated by Pierce bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Protein samples (20 µg) were then resolved using 12.5% SDS polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane for 1 h. Afterward, membranes were blocked for 1 h at room temperature with 1% PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in TBST/0.05% Tween-20 buffer to avoid unspecific protein signals. Primary antibodies claudin-1 (1:1000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), claudin-3 (1:1000; Invitrogen), claudin-4 (1:1000; Invitrogen), claudin-5 (1:1000; Invitrogen), tricellulin (1:2000; Invitrogen), occludin (1:1000; Proteintech Rosemont, IL, USA), and anti-GAPDH as a loading control (1:10,000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were incubated, shaking overnight at 4 °C. Membranes were then incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody, either goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) at room temperature for 2 h. For protein detection, membranes were incubated with SuperSignal West Pico PLUS Stable Peroxide Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Chemiluminescence was measured using the FUSION FX imaging system (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany). For quantification of protein bands, densitometric analysis of the Western blots was performed by ImageJ software (Rasband, W. S., ImageJ, National Institute of Health (NIH), Bethesda, MD, USA).

#### 4.5. Immunostaining and Super-Resolution STED Microscopy

TJ protein localization in epithelial cell monolayers was analyzed by confocal laser-scanning microscopy (CLSM) or super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy. Cells grown on 3 µM PCF filters were washed twice with PBS and fixed for 20 min in 2% paraformaldehyde (PFA; Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Primary antibodies were raised against claudin-4 (1:100; Invitrogen), occludin (1:100; Invitrogen), tricellulin (1:400; Invitrogen), and ZO-1 (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and incubated overnight at 4 °C. Secondary antibodies were either conjugated to Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) or Alexa Fluor 594 (1:500; Invitrogen) for CLSM or Abberior STAR RED and Abberior STAR ORANGE (1:200; Abberior GmbH, Göttingen, Germany). F-actin was stained using Phalloidin DY-647P1 (1:500; Dyomics GmbH, Jena, Germany) or Abberior STAR RED (1:100; Abberior GmbH) and incubated 120 min at room temperature. For CLSM, nuclei were stained with DAPI (1:1000; Roche AG). After incubation, cells on the filters were washed twice with PBS and once with distilled water, then mounted on glass slides using either ProTaq Mount Fluor (Biocyc, Luckenwalde, Germany) or a heated mounting medium (Abberior GmbH) to 65 °C. For STED microscopy, each filter was fixed with a STED-compatible cover slide (Carl Zeiss, Jena, Germany). Localization and subcellular distribution of TJ proteins was determined by confocal laser scanning (Zeiss LSM780, Jena, Germany) and STED (Abberior Facility Line, Abberior GmbH) microscopy.

#### 4.6. Inhibitor Studies

Eight-day-old cells grown on filter supports were placed in a 12-well plate. For the inhibition of apoptosis, the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh hydrate (10 µM; Calbiochem, San Diego, CA, USA) dissolved in DMSO was applied. A medium containing the inhibitor was added on the basal side 1 h before the toxin treatment. To study MLCK inhibition, the culture medium was supplemented with the specific MLCK pseudosubstrate inhibitor D-reverse PIK (200 µM) [20]. The D-reverse PIK was added apically, 30 min prior to CDT treatment.

#### 4.7. Statistics

Data are expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software version 7, San Diego,

CA, USA). *p*-values were calculated either by Student's *t*-test with Bonferroni correction or by one-way ANOVA with Bonferroni correction. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.H. and J.-D.S.; methodology, M.S., L.H. and R.B.; validation, R.B., R.G. and M.S.; formal analysis, L.H.; investigation, L.H.; resources, R.G.; writing—original draft preparation, L.H. and R.B.; writing—review and editing, R.G. and J.-D.S.; visualization, L.H.; supervision, J.-D.S.; project administration, R.B.; funding acquisition, R.B. and J.-D.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number Schu 559/11-5 and GRK 2318-2, project C1.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this article.

**Acknowledgments:** In-Fah Maria Lee is gratefully acknowledged for her excellent technical support. We thank John Heneghan and Jerrold R. Turner, Boston, MA, USA, for the supply of the inhibitor PIK. Thanks to Jörg Piontek and Dorothee Günzel for the support and the grant for the STED microscope supported by the DFG.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Abt, M.C.; McKenney, P.T.; Pamer, E.G. Clostridium Difficile Colitis: Pathogenesis and Host Defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 609–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Magill, S.S.; Edwards, J.R.; Bamberg, W.; Beldavs, Z.G.; Dumyati, G.; Kainer, M.A.; Lynfield, R.; Maloney, M.; McAllister-Hollod, L.; Nadle, J.; et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1198–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Guery, B.; Galperine, T.; Barbut, F. Clostridioides Difficile: Diagnosis and Treatments. *BMJ* **2019**, *366*, l4609. [[CrossRef](#)]
4. López-Cárdenas, S.; Torres-Martos, E.; Mora-Delgado, J.; Sánchez-Calvo, J.M.; Santos-Peña, M.; Zapata López, Á.; Dolores López-Prieto, M.; Pérez-Cortés, S.; Carlos Alados, J. The Prognostic Value of Toxin B and Binary Toxin in Clostridioides Difficile Infection. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1884516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Young, M.K.; Leslie, J.L.; Madden, G.R.; Lyerly, D.M.; Carman, R.J.; Lyerly, M.W.; Stewart, D.B.; Abhyankar, M.M.; Petri, W.A. Binary Toxin Expression by Clostridioides Difficile Is Associated with Worse Disease. *Open Forum Infect. Dis.* **2022**, *9*, ofac001. [[CrossRef](#)]
6. Aktories, K.; Schwan, C.; Jank, T. Annual Review of Microbiology Clostridium Difficile Toxin Biology. *Annu. Rev. Microbiol.* **2017**, *71*, 281–307. [[CrossRef](#)]
7. Gülke, I.; Pfeifer, G.; Liese, J.; Fritz, M.; Hofmann, F.; Aktories, K.; Barth, H. Characterization of the Enzymatic Component of the ADP-Ribosyltransferase Toxin CDTa from Clostridium Difficile. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6004–6011. [[CrossRef](#)]
8. Martínez-Meléndez, A.; Cruz-López, F.; Morfin-Otero, R.; Maldonado-Garza, H.J.; Garza-González, E. An Update on Clostridioides Difficile Binary Toxin. *Toxins* **2022**, *14*, 305. [[CrossRef](#)]
9. Stieglitz, F.; Gerhard, R.; Pich, A. The Binary Toxin of Clostridioides Difficile Alters the Proteome and Phosphoproteome of HEp-2 Cells. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 725612. [[CrossRef](#)]
10. Jin, Y.; Blikslager, A.T. The Regulation of Intestinal Mucosal Barrier by Myosin Light Chain Kinase/Rho Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3550. [[CrossRef](#)]
11. Nusrat, A.; von Eichel-Streiber, C.; Turner, J.R.; Verkade, P.; Madara, J.L.; Parkos, C.A. Clostridium Difficile Toxins Disrupt Epithelial Barrier Function by Altering Membrane Microdomain Localization of Tight Junction Proteins. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1329–1336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Krug, S.M.; Amasheh, S.; Richter, J.F.; Milatz, S.; Günzel, D.; Westphal, J.K.; Huber, O.; Schulzke, J.D.; Fromm, M. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3713–3724. [[CrossRef](#)]
13. Krug, S.M.; Bojarski, C.; Fromm, A.; Lee, I.M.; Dames, P.; Richter, J.F.; Turner, J.R.; Fromm, M.; Schulzke, J.D. Tricellulin Is Regulated via Interleukin-13-Receptor A2, Affects Macromolecule Uptake, and Is Decreased in Ulcerative Colitis. *Mucosal Immunol.* **2018**, *11*, 345–356. [[CrossRef](#)]
14. Bjarnason, I.; Ward, K.; Peters, T.J. The Leaky Gut of Alcoholism: Possible Route of Entry for Toxic Compounds. *Lancet* **1984**, *323*, 179–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Bückner, R.; Schulz, E.; Günzel, D.; Bojarski, C.; Lee, I.F.M.; John, L.J.; Wiegand, S.; Janßen, T.; Wieler, L.H.; Dobrindt, U.; et al.  $\alpha$ -Haemolysin of *Escherichia Coli* in IBD: A Potentiator of Inflammatory Activity in the Colon. *Gut* **2014**, *63*, 1893–1901. [[CrossRef](#)]
16. Bergann, T.; Fromm, A.; Borden, S.A.; Fromm, M.; Schulzke, J.D. Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na<sup>+</sup> channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 432–439. [[CrossRef](#)]
17. Günzel, D.; Fromm, M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 1819–1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kaak, J.L.; Lobo de Sá, F.D.; Turner, J.R.; Schulzke, J.D.; Bückner, R. Unraveling the Intestinal Epithelial Barrier in Cyanotoxin Microcystin-Treated Caco-2 Cell Monolayers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2022**, *1516*, 188–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bückner, R.; Krug, S.M.; Rosenthal, R.; Günzel, D.; Fromm, A.; Zeitz, M.; Chakraborty, T.; Fromm, M.; Epple, H.J.; Schulzke, J.D. Aerolysin from *Aeromonas Hydrophila* Perturbs Tight Junction Integrity and Cell Lesion Repair in Intestinal Epithelial HT-29/B6 Cells. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1283–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Owens, S.E.; Graham, W.V.; Siccardi, D.; Turner, J.R.; Mrsny, R.J. A Strategy to Identify Stable Membrane-Permeant Peptide Inhibitors of Myosin Light Chain Kinase. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 703–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gerding, D.N.; Johnson, S.; Rupnik, M.; Aktories, K. Clostridium Difficile Binary Toxin CDT: Mechanism, Epidemiology, and Potential Clinical Importance. *Gut Microbes* **2013**, *5*, 15–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Stiles, B.G.; Pradhan, K.; Fleming, J.M.; Samy, R.P.; Barth, H.; Popoff, M.R. Clostridium and Bacillus Binary Enterotoxins: Bad for the Bowels, and Eukaryotic Being. *Toxins* **2014**, *6*, 2626–2656. [[CrossRef](#)]
23. Landenberger, M.; Nieland, J.; Roeder, M.; Nørgaard, K.; Papatheodorou, P.; Ernst, K.; Barth, H. The Cytotoxic Effect of Clostridioides Difficile Pore-Forming Toxin CDTb. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2021**, *1863*, 183603. [[CrossRef](#)]
24. Payne, A.M.; Zorman, J.; Horton, M.; Dubey, S.; ter Meulen, J.; Vora, K.A. Caspase Activation as a Versatile Assay Platform for Detection of Cytotoxic Bacterial Toxins. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2970–2976. [[CrossRef](#)]
25. Shashikanth, N.; France, M.M.; Xiao, R.; Haest, X.; Rizzo, H.E.; Yeste, J.; Reiner, J.; Turner, J.R. Tight Junction Channel Regulation by Interclaudin Interference. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 3780. [[CrossRef](#)]
26. Ikenouchi, J.; Sasaki, H.; Tsukita, S.; Furuse, M.; Tsukita, S.; Mostov, K.E. Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 4687–4693. [[CrossRef](#)]
27. Buschmann, M.M.; Shen, L.; Rajapakse, H.; Raleigh, D.R.; Wang, Y.; Wang, Y.; Lingaraju, A.; Zha, J.; Abbott, E.; McAuley, E.M.; et al. Occludin OCEL-Domain Interactions Are Required for Maintenance and Regulation of the Tight Junction Barrier to Macromolecular Flux. *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 3056–3068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Harrer, A.; Bückner, R.; Boehm, M.; Zarzecka, U.; Tegtmeyer, N.; Sticht, H.; Schulzke, J.D.; Backert, S. Campylobacter Jejuni Enters Gut Epithelial Cells and Impairs Intestinal Barrier Function through Cleavage of Occludin by Serine Protease HtrA. *Gut Pathog.* **2019**, *11*, 4. [[CrossRef](#)]
29. Krug, S.M. Contribution of the Tricellular Tight Junction to Paracellular Permeability in Leaky and Tight Epithelia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1397*, 219–230. [[CrossRef](#)]
30. Lyon, S.A.; Hutton, M.L.; Rood, J.I.; Cheung, J.K.; Lyras, D. CdtR Regulates TcdA and TcdB Production in Clostridium Difficile. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Tao, L.; Zhang, J.; Meraner, P.; Tovaglieri, A.; Wu, X.; Gerhard, R.; Zhang, X.; Stallcup, W.B.; Miao, J.; He, X.; et al. Frizzled Proteins Are Colonic Epithelial Receptors for C. Difficile Toxin B. *Nature* **2016**, *538*, 350–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yuan, P.; Zhang, H.; Cai, C.; Zhu, S.; Zhou, Y.; Yang, X.; He, R.; Li, C.; Guo, S.; Li, S.; et al. Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 Functions as the Cellular Receptor for Clostridium Difficile Toxin B. *Cell Res.* **2015**, *25*, 157–168. [[CrossRef](#)]
33. Hemmasi, S.; Czulkies, B.A.; Schorch, B.; Veit, A.; Aktories, K.; Papatheodorou, P. Interaction of the Clostridium Difficile Binary Toxin CDT and Its Host Cell Receptor, Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14031–14044. [[CrossRef](#)]
34. Masuda, S.; Oda, Y.; Sasaki, H.; Ikenouchi, J.; Higashi, T.; Akashi, M.; Nishi, E.; Furuse, M. LSR Defines Cell Corners for Tricellular Tight Junction Formation in Epithelial Cells. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 548–555. [[CrossRef](#)]
35. Marquardt, I.; Jakob, J.; Scheibel, J.; Hofmann, J.D.; Klawonn, F.; Neumann-Schaal, M.; Gerhard, R.; Bruder, D.; Jansch, L. Clostridioides Difficile Toxin CDT Induces Cytotoxic Responses in Human Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 752549. [[CrossRef](#)]
36. Nibbering, B.; Gerding, D.N.; Kuijper, E.J.; Zwitterink, R.D.; Smits, W.K. Host Immune Responses to Clostridioides Difficile: Toxins and Beyond. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 804949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Geric, B.; Carman, R.J.; Rupnik, M.; Genheimer, C.W.; Sambol, S.P.; Lyerly, D.M.; Gerding, D.N.; Johnson, S. Binary Toxin-Producing, Large Clostridial Toxin-Negative Clostridium Difficile Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. *J. Infect. Dis.* **2006**, *193*, 1143–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kuehne, S.A.; Cartman, S.T.; Minton, N.P. Both, Toxin A and Toxin B, Are Important in Clostridium Difficile Infection. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 252–255. [[CrossRef](#)]
39. Ernst, K.; Landenberger, M.; Nieland, J.; Nørgaard, K.; Frick, M.; Fois, G.; Benz, R.; Barth, H. Characterization and Pharmacological Inhibition of the Pore-Forming Clostridioides Difficile Cdtb Toxin. *Toxins* **2021**, *13*, 390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wiegand, S.; Zakrzewski, S.S.; Eichner, M.; Schulz, E.; Günzel, D.; Pieper, R.; Rosenthal, R.; Barmeyer, C.; Bleich, A.; Dobrindt, U.; et al. Zinc Treatment Is Efficient against *Escherichia Coli*  $\alpha$ -Haemolysin-Induced Intestinal Leakage in Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45649. [[CrossRef](#)]



41. Shen, L.; Black, E.D.; Witkowski, E.D.; Lencer, W.I.; Guerriero, V.; Schneeberger, E.E.; Turner, J.R. Myosin Light Chain Phosphorylation Regulates Barrier Function by Remodeling Tight Junction Structure. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2095–2106. [[CrossRef](#)]
42. Odenwald, M.A.; Turner, J.R. The Intestinal Epithelial Barrier: A Therapeutic Target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 9–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ayala-Torres, C.; Krug, S.M.; Rosenthal, R.; Fromm, M. Angulin-1 (LSR) Affects Paracellular Water Transport, However Only in Tight Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Beer, L.A.; Tatge, H.; Schneider, C.; Ruschig, M.; Hust, M.; Barton, J.; Thiemann, S.; Fühner, V.; Russo, G.; Gerhard, R. The Binary Toxin CDT of *Clostridium Difficile* as a Tool for Intracellular Delivery of Bacterial Glucosyltransferase Domains. *Toxins* **2018**, *10*, 225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **Lebenslauf**

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



## Komplette Publikationsliste

### Journals:

Tchartchian, G., Bojahr, B., **Heils, L.**, Krentel, H., De Wilde, RL (2022). Prophylactic Salpingectomy during Hysterectomy for Benign Disease: A Prospective Study to Evaluate High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Precursors. *Journal Clinical Medicine*, 12(1), 296. <https://doi.org/10.3390/jcm12010296> (IF 3,9)

**Heils, L.**, Schneemann, M., Gerhard, R., Schulzke, J. D., & Bücken, R. (2023). CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins1501005> (IF 4,2)

Schneemann, M., **Heils, L.**, Moos, V., Weiner, J., Beule, D., Gerhard, R., Schulzke, J-D., Bücken, R (2023). A colonic organoid model challenged with TcdB the large toxin of *Clostridioides difficile* exhibits deregulated tight junction proteins. *Toxins*. 15(11), 643. <https://doi.org/10.3390/toxins15110643> (IF 4,2)

### Konferenzbeiträge:

**Heils, L.**, Schneemann, M., Schulzke, J-D., Bücken, R. *Clostridioides difficile* binary toxin (CDT) effects on the epithelial barrier function. *74th Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology e.V. (DGHM)*. 05. - 07.09.2022, Berlin, Deutschland (Poster)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt PD Roland Felix Bücken für seine umfassende Betreuung meiner Dissertation. Diese erstreckte sich über den gesamten Forschungsprozess hinweg, einschließlich seiner Unterstützung beim Erlernen der Methoden und der geduldigen Begleitung durch den Publikationsprozess.

Ich möchte zudem Prof. Jörg-Dieter Schulzke für die Überlassung des Promotionsthemas danken und seine umfassende Betreuung und seine ständige Bereitschaft, fachliche Diskussionen zu führen. Sein persönliches Mentoring war für mich von großem Wert.

Danken möchte ich auch M.Sc. Martina Schneemann für die fruchtbare Zusammenarbeit, Ihre Unterstützung beim Erlernen von Methoden und der Durchführung meiner Versuche und die vielen Diskussionen von Daten und Ergebnissen. Zudem danke ich Dr. Fábía Lobo de Sá für Ihre geduldige Anleitung, die mir sehr beim Erlernen neuer Methoden geholfen hat.

Anja Fromm und In-Fah Lee möchte ich für Ihre stets engagierte Unterstützung im Labor danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Sonnenfeldstiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Ein großer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Danke Alexandra, dass du mich durch die Zeit meiner Promotion begleitet hast und immer an meiner Seite warst.