

## **Evaluation of Chondroitin sulfate proteoglycan-4 and frizzled-1,2,7 for cytopathic and cytotoxic effects of TcdB from historic and hypervirulent *Clostridioides difficile* strains**

*Clostridioides difficile* ist ein gram-positives und sporenbildendes Bakterium, welches die Hauptursache für nosokomiale, Antibiotika-induzierte Diarrhoe abbildet. Dieses Krankheitsbild wird vor allem durch zwei von *C. difficile* produzierte Toxine (TcdA und TcdB) ausgelöst. Beide Toxine sind ca 300 kDa große Proteine, die als Glukosyltransferasen intrazellulär kleine Rho-GTPasen durch Monoglukosylierung inaktivieren. Dies führt zur Zerstörung der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Abrundung der Zellen. Diese drastische morphologische Veränderung ist im Labor eine valide und sichere Methode, um die Aktivität der Toxine nachzuweisen.

Um in die Zellen zu gelangen, binden die Toxine zunächst an ihre Rezeptoren auf den Zelloberflächen, woraufhin sie rezeptorvermittelt endozytiert werden. Bisher wurden für den Hauptvirulenzfaktor TcdB drei Rezeptoren identifiziert: Chondroitin sulfate proteoglycan-4 (CSPG4/NG2), poliovirus-receptor like 3 (PVRL3/Nektin-3) und die Wnt-Rezeptorproteine Frizzled1,2,7 (FZD1,2,7). Während die Binderegionen für CSPG4 und FZD1,2,7 identifiziert sind, ist die funktionelle Bindung an PVRL3 und eine dadurch vermittelte Toxinaufnahme noch nicht validiert. Unsere Untersuchungen belegen aber, dass der Anteil von PVRL3 an der Toxinaufnahme vernachlässigbar gering ist.

Die CSPG4- und FZD-Rezeptorbindedomänen von TcdB wurden bisher ausschließlich isoliert und unabhängig von der jeweils anderen untersucht, obwohl sie in enger räumlicher Nähe im Toxinmolekül liegen. In unserer Arbeit haben wir deshalb eine mögliche Abhängigkeit beider Rezeptorbindedomänen untersucht, sowie den jeweiligen Anteil der Rezeptoren auf die Wirkung von TcdB bestimmt. Dazu haben wir rekombinantes TcdB sowohl vom historischen Stamm VPI10463 der Klade I („TcdB<sub>VPI</sub>“) als auch vom „hypervirulenten“ Stamm R20291 der Clade II („TcdB<sub>R20</sub>“) hergestellt. Zusätzlich haben wir Varianten eingesetzt, die entweder nicht an CSPG4 (TcdB $\Delta$ CROPs), oder nicht an FZD1,2,7 (TcdB<sub>VPI</sub>F1597S) oder an keinen der beiden Rezeptoren (TcdB<sub>VPI</sub> $\Delta$ CROPs F1597S) mehr binden können. Zudem haben wir komplementär in Zellabrundungsassays und Zytotoxizitätstests HeLa-wildtyp und HeLa CSPG4<sup>-/-</sup>-Zellen verwendet. Wir konnten zeigen, dass CSPG4 der Hauptrezeptor sowohl für TcdB<sub>VPI</sub> (70 %) als auch für TcdB<sub>R20</sub> (90 %) hinsichtlich der cytopathischen Wirkung ist. Darüber vermittelt CSPG4 in diesem Zellsystem fast ausschließlich die cytotoxische Wirkung.

Für die Bindung von TcdB an FZD1,2,7 ist ein Phenylalanin (F1597) essentiell, welches in TcdB<sub>R20</sub> durch ein Serin ersetzt ist. TcdB vom hypervirulentem Stamm bindet folglich nicht an FZD1,2,7. Vor diesem Hintergrund haben wir die Mutante TcdB<sub>VPI</sub>F1597S hergestellt, die eine 30 %-ig geringere cytopathische Wirkung besitzt.

Durch den Einsatz von Toxinen, bei denen jeweils eine spezifische Rezeptorbindestelle außer Kraft gesetzt wurde und den HeLa-Zellen, denen CSPG4 als Rezeptor fehlt, konnten wir ableiten, dass die Aufnahme über beide Rezeptoren additiv sein muss. Beide Rezeptorbindestellen können unabhängig die Toxinaufnahme vermitteln. Damit bedeutet das Zwei-Rezeptor-Modell für TcdB eine Erweiterung des Zielzellspektrums und nicht - wie etwa bei den *C. botulinum* Neurotoxinen - eine erhöhte Zellspezifität. Die erhöhte Zellspezifität findet erst durch Wegfall einer funktionellen Rezeptorbindung statt, wie es beim TcdB<sub>R20</sub> vom hypervirulenten Stamm der Fall ist. Unsere Ergebnisse erlauben nun, die stärkere inflammatorische Wirkung der hypervirulenten *C. difficile* Stämme auf die fokussierte Wirkung von deren TcdB auf CSPG4-positive Zellen, wie Immunzellen oder Zellen des enterischen Nervensystems, zurückzuführen.