

GT – Toxin Award

Bindung des von *Yersinia pseudotuberculosis* produzierten Zytotoxisch nekrotisierende Faktors (CNFY) an seinen zellulären Rezeptor

Stefanie Kowarschik

Institut für Klinische und Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Freiburg

Der Zytotoxisch nekrotisierende Faktor (CNFY) ist ein Proteintoxin, welches neben einer Reihe weiterer Virulenzfaktoren entscheidend zur Pathogenität des Bakteriums *Yersinia pseudotuberculosis* beiträgt. Der Erreger befällt in erster Linie Nagetiere, allerdings treten auch Infektionen beim Menschen über die Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel oder Wasser auf. Eine Infektion mit dem Keim führt bei Nagetieren und beim Menschen zu einer fieberhaften Darmentzündung der so genannten Yersiniose.

Das 115 kDa große Proteintoxin ist modular aus einer N-terminalen Domäne, einer darauffolgenden Translokationsdomäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut. CNFY zeigt eine hohe Sequenzidentität (~ 67 %) zu den anderen bekannten CNFs von *Escherichia coli* wie zum Beispiel CNF1. Die Aufnahme von CNFY erfolgt über einen noch nicht identifizierten, zellulären Rezeptor, welcher zusammen mit dem Toxin endozytotisch aufgenommen wird. Die Wirkung von CNFY basiert auf der Deamidierung einer spezifischen Aminosäure der RhoGTPasen, welche der Zelle als molekulare Schalter dienen und zahlreiche Prozesse, insbesondere die Organisation des Aktinzytoskeletts, regulieren. Hierbei modifiziert CNFY spezifisch die RhoGTPasen RhoA, B und C [1]. Die Deamidierung führt zu einer konstitutiven Aktivierung der verschiedenen Rho-Proteine, welche sich in diversen zellmorphologischen Veränderungen, wie der Ausbildung von Stressfasern oder einer Mehrkernigkeit der Zellen, äußert.

Unser Forschungsinteresse gilt dem zellulären Rezeptor, der für die Bindung von CNFY an die Zelloberfläche verantwortlich ist. Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde das Bindungsverhalten von CNFY auf HeLa Zellen untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass CNFY in großen Mengen an die Zellen anlagert wird, ohne eine Sättigung der Bindung zu erreichen. Die Konzentrationen an gebundenem CNFY lagen hierbei weit außerhalb eines für das Toxin physiologisch relevanten Bereiches. Zudem konnten wir mittels Generierung einer N-terminalen Verkürzung von CNFY zeigen, dass die katalytische Domäne von Aminosäure 709-1014 wichtig für die Bindung des Toxins an die Zielzellen ist und dass sich auch diese Domäne von CNFY in großen Mengen an die Zellen anlagert. Diesen Beobachtungen folgend lag die Hypothese nahe, dass CNFY an eine häufig vorkommende Oberflächenstruktur der Zelle bindet.

Versuche mit Ramos Zellen, einer B-lymphozytischen menschlichen Zelllinie gaben uns auf der Suche nach dem möglichen Rezeptor für CNFY einen entscheidenden Hinweis. Bei diesen Zellen konnten wir keine Bindung oder RhoA Deamidierung von CNFY nachweisen. Diese Zellen exprimieren nur sehr geringe Mengen Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) [3]. Die negativ geladenen HSPGs sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix und Plasmamembran tierischer Zellen, wo sie in großen Mengen vorkommen. In der Aminosäuresequenz von CNFY konnten wir zwei für die HSPG-Bindung wichtige Motive identifizieren: Diese liegen in der N-terminalen Domäne als auch in der C-terminalen katalytischen Domäne. Ein solches Motiv konnte beim nahe verwandten CNF1 nicht identifiziert werden. Eine Inhibition der HSPG-Synthese durch Natriumchlorat führte zu einer reduzierten Bindung von CNFY und dessen katalytischer Domäne von 709-1014, nicht aber

für CNF1. Zudem konnte gezeigt werden, dass HSPGs nicht nur essentiell für die Bindung von CNFY sind, sondern auch für die Vergiftung der Zellen [3]. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte eine Inkubation der Toxine mit dem Heparin-ähnlichen Polysaccharid Dextransulfat, das mit den HSPGs um Toxinbindung kompetiert. Die Bindung von CNFY und der katalytischen Domäne an die Zellen wurde hierdurch deutlich reduziert.

Zusammenfassend zeigen unsere Befunde, dass HSPGs wichtig für eine Anlagerung und Aufnahme von CNFY sind. Ob diese Strukturen als Haupt- oder Co-Rezeptoren dienen wird derzeit durch massenspektrometrische Untersuchungen geklärt. Eine Identifikation des zellulären Rezeptors, der für die Aufnahme des Toxins wichtig ist, liefert neue Einblicke in die Wirkungsweise von CNFY und dessen Rolle in der Pathogenität von *Y. pseudotuberculosis*.

[1] Hoffmann C, Schmidt G (2004) CNF and DNT. *Rev PhysiolBiochem Pharmacol* 152:49–63.

[2] Reijmers R, Spaargaren M, Pals S (2013) Heparan sulfate proteoglycans in the control of B cell development and the pathogenesis of multiple myeloma. *FEBS J.* 280(10):2180-93.

[3] Blumthal B, Hoffmann C, Aktories K, Backert S, Schmidt G (2007) The Cytotoxic Necrotizing Factor from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* Bind to Different Cellular Receptors but Take the Same Route to the Cytosol. *Infect Immun* 75(7): 3344–3353.