

Toxine und Signaling

Bakterielle Toxine aktivieren GTPasen durch Deamidierung

JOACHIM ORTH, GUDULA SCHMIDT, KLAUS AKTORIES
INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE UND
TOXIKOLOGIE, UNIVERSITÄT FREIBURG

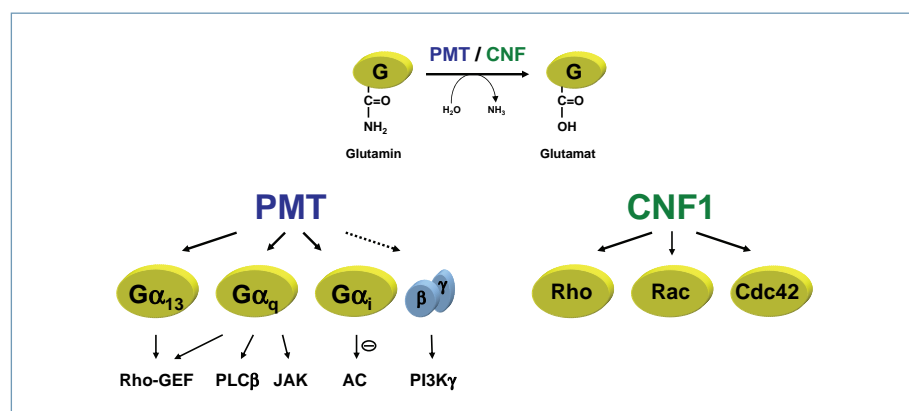
***Pasteurella multocida*-Toxin und die Zytotoxischen Nekrotisierenden Faktoren (CNFs) von *E. coli* und *Yersinia* deamidieren heterotrimerer G-Proteine bzw. Rho-Proteine und aktivieren hierdurch die GTPasen mit drastischen Folgen für die zelluläre Signaltransduktion.**

Pasteurella multocida Toxin and Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs), produced by *E. coli* and *Yersinia*, deamidate heterotrimeric G proteins or Rho proteins thereby activating the GTPases resulting in drastic changes of cell signaling.

■ Signalproteine der Rho-Familie sowie heterotrimerer G-Proteine werden durch unterschiedliche bakterielle Proteintoxine gehemmt oder aktiviert. Eine Hemmung der Rho-GTPasen erfolgt durch Glukosylierung (z. B. Toxin A und B aus *Clostridium difficile*) und ADP-Ribosylierung (C3-Toxine aus *C. botulinum*). Aktiviert werden die Rho-GTPasen durch Zytotoxische Nekrotisierende Faktoren (CNFs), die von pathogenen *E. coli*-Stämmen (CNF1, CNF2 und CNF3) und von *Yersinia pseudotuberculo-*

sis (CNFY) produziert werden und Deamidase-Aktivität besitzen [1].

Während lange bekannt ist, dass Cholera-Toxin und Pertussis-Toxin heterotrimerer G-Proteine durch ADP-Ribosylierung aktivieren bzw. inhibieren, wurde erst kürzlich gezeigt, dass das *Pasteurella multocida*-Toxin (PMT) wie die CNFs als bakterielle Deamidase wirkt und $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine durch Deamidierung aktiviert (**Abb. 1**).



▲ **Abb. 1:** Schema der konstitutiven Aktivierung von GTPasen durch Deamidierung und Signaltransduktion der aktivierten G-Proteine. Sowohl PMT als auch CNF aktivieren G-Proteine durch Deamidierung eines für die GTP-Hydrolyse essenziellen Glutamins zu Glutamat. PMT wirkt auf die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, G_{13} , G_q und G_i . Die entsprechenden Effektoren werden aktiviert (Phospholipase(PLC) β), Janus-Kinase (JAK), Rho-guanine nucleotide exchange factor, Rho-GEF) oder gehemmt (Adenylatcyclase, AC). Durch Wirkung auf G-Proteine werden ebenfalls $\beta\gamma$ -abhängige Signalwege aktiviert (Aktivierung der PI3-Kinase γ). CNF1 aktiviert Rho, Rac und Cdc42.

PMT wird von *Pasteurella multocida*, einem opportunistischen Keim vieler Haus- und Nutztiere, gebildet. Auf den Menschen wird der Keim durch Biss- und Kratzverletzungen übertragen. Es kommt zu Wundinfektionen und selten zu systemischen Infektionen (z. B. Meningitis oder Endocarditis). Ökonomisch wichtig ist die atrophische Rhinitis durch *P. multocida* in der Nutztierhaltung bei Schweinen. Hierbei treten eine Atrophie der Nasenmuschelknochen und eine Verkrümmung des Rüssels auf, die durch *P. multocida*-Toxin ausgelöst werden.

Struktur von PMT und CNF

PMT ist ein 146-kDa-Proteintoxin. Im C-Terminus ist der biologisch aktive Teil lokalisiert, während die Rezeptorbindung und Translokation in Zielzellen über N-terminale Strukturen erfolgt. Da die N-Termini von PMT und CNF Sequenzhomologien aufweisen, geht man von ähnlichen Aufnahmemechanismen aus.

Die Kristallstruktur eines C-terminalen PMT-Fragments (Aminosäuren 575 bis 1.285) wurde kürzlich aufgeklärt [2]. Dieses aktive Toxinfragment besteht aus den drei Domänen C1, C2 und C3 (**Abb. 2**). Während die Strukturanalyse nur wenig neue Kenntnisse zur Funktion der C1- und C2-Domäne lieferte, zeigte die C3-Domäne eine Ähnlichkeit zu Thiolproteasen mit einem typischen katalytischen Zentrum aus Cys-1.165, His-1.205 und Asp-1.220. Die Lokalisation der biologischen Aktivität des Holotoxins in der C3-Domäne wurde durch die Expression dieser Domäne in Säugerzellen bestätigt.

Alle CNFs haben eine molekulare Masse von ca. 115 kDa und sind wie PMT einkettige Proteintoxine mit einer N-terminal lokalisierten Rezeptorbindedomäne und einer katalytischen Domäne am C-Terminus (Aminosäuren 720 bis 1.014). Die Kristallstruktur des katalytischen C-Terminus zeigt eine einzigartige Proteinfaltung mit zentralen β -Faltblättern, die von α -Helices und Schleifen umgeben sind [3]. Neun dieser Schleifen umkleiden den Eingang einer katalytischen Tasche. Das katalytische Zentrum besteht aus

einer Triade mit Cys-866, His-881 und Val-833 als essenzielle Aminosäuren.

Zelluläre Aufnahme der Toxine

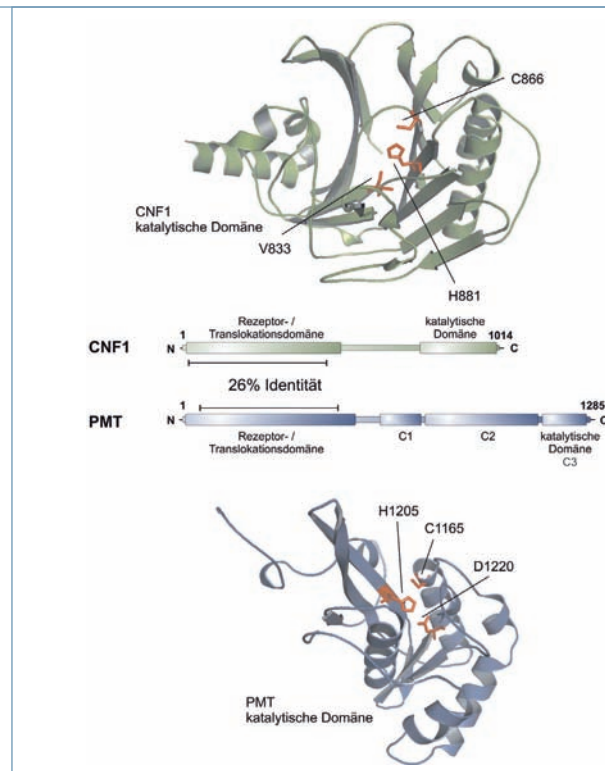
PMT und alle CNFs werden durch rezeptorvermittelte Endozytose in Säugerzellen aufgenommen [1]. Der Rezeptor für PMT ist nicht bekannt. Als Rezeptor für CNF1 und CNF2 wird der Nicht-Integrin-p67-Lamininrezeptor diskutiert, dessen zytosolisches Vorläufermolekül (p37) im Hefesystem mit der Rezeptorbindedomäne von CNF1 interagiert. CNF3 und CNFY werden in ein geringeres Spektrum von Säugerzellen aufgenommen, was einen anderen Rezeptor für diese Toxine nahelegt. Nach der Endozytose führt die Ansäuerung des frühen Endosoms zu einer Strukturänderung der Toxine, die eine Transmembrandomäne, bestehend aus zwei zentralen hydrophoben Helices, exponiert. Diese Helices inserieren wahrscheinlich in Endosomenmembranen und führen zur Translokation in das Zytosol. CNF1 wird nicht als Holotoxin ins Zytosol aufgenommen, sondern zwischen Aminosäure 532 und 544 gespalten. Ein 55 kDa-Fragment, das die katalytische Domäne umfasst, gelangt ins Zytosol. Es ist aber nicht klar, welche Protease CNF1 schneidet und wie der Durchtritt durch die Endosomenmembran erfolgt. Des Weiteren ist unklar, ob auch PMT während der Aufnahme prozessiert wird.

PMT-aktivierte Signalwege

PMT aktiviert verschiedene Signalwege und wirkt als potentes Mitogen. All diese Effekte werden mit der Aktivierung heterotrimerer G-Proteine in Verbindung gebracht.

Bereits niedrige Konzentrationen (< 1 pM) von PMT führen zu einer mitogenen Wirkung in Maus-3T3-Zellen oder humanen Fibroblasten [4]. Die für den mitogenen Effekt entscheidenden Signalwege sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist nur soviel bekannt, dass zellspezifisch (z. B. in HEK293-Zellen) der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) G_q -abhängig transaktiviert wird. In Cardiomyozyten wurde dagegen eine EGFR-unabhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Weges durch PMT beschrieben [5].

PMT stimuliert über G_q die Phospholipase $C\beta$ (PLC β) und führt zur Bildung von Inositoltrisphosphat und zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dabei aktiviert PMT die PLC β nur über G_q , nicht aber über G_{11} [6]. Dies ist insofern bemerkenswert, als G_q und G_{11} zu 89 Prozent identisch sind und generell alle heptahelikalen Membranrezeptoren (GPCRs), die an G_q koppeln, auch



◀ **Abb. 2:** Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von CNF1 (Aminosäuren 720–1.014; 1HQ0) und PMT (Aminosäuren 1.105–1.285; 2EBF), die jeweils im C-Terminus lokalisiert sind. Die katalytische Triade ist hervorgehoben (CNF1: Cystein, Histidin und Valin; PMT: Cystein, Histidin und Aspartat). Eine Strukturähnlichkeit lässt sich nicht feststellen. In der Balkendarstellung der Holotoxine ist der Bereich mit homologer Sequenz markiert. Er liegt im N-Terminus, dem Bereich der Rezeptorbindungs- und Translokationsdomänen.

G_{11} aktivieren. PMT unterscheidet die beiden G-Proteine anhand der helikalen Domäne, die einen Einschub in die funktionelle GTPase-Domäne darstellt. Wird eine Helix ($\alpha\beta$) von G_q in G_{11} eingesetzt, wird diese Chimäre durch PMT aktiviert [7].

Durch Stimulation der heterotrimeren G-Proteine $G_{12/13}$ aktiviert PMT RhoA und führt typischerweise zur Stressfaserbildung. Allerdings wird RhoA auch über G_q aktiviert. Neben G_q und $G_{12/13}$ aktiviert PMT auch G_i und inhibiert hierdurch die Adenylat-cyclase. Die Identifizierung von G_i als Substrat von PMT war von eminenter Bedeutung für die Aufklärung des molekularen Mechanismus des Toxins. G_i kann nämlich als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert werden. Die massenspektrometrische Analyse von G_{12} , das mit PMT in *E. coli* koexprimiert wurde, ergab eine Massendifferenz von einem Dalton als Folge einer Deamidierung von Glutamin-205 [8]. Dieses Glutamin ist essenziell für die inhärente GTPase-Aktivität heterotrimerer G-Proteine und stabilisiert den pentavalenten Übergangszustand der GTP-Hydrolyse. Die durch PMT katalysierte Deamidierung inhibiert die GTP-Hydrolyse und arretiert das G-Protein im aktiven, GTP-gebundenen Zustand. Äquivalent zu Glutamin-205 in G_{12} ist das Glutamin-209 in G_q , das ebenfalls deamidiert wird.

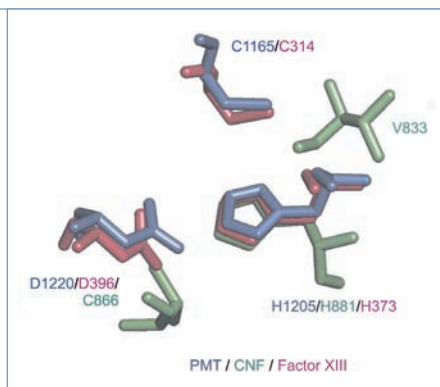
PMT wirkt zwar direkt auf die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, stimuliert aber durch die Aktivierung von $G\alpha$ die Freisetzung von $G\beta\gamma$. So führt PMT zu einer Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) γ , die ein typischer Effektor von $G\beta\gamma$ ist.

Molekularer Wirkmechanismus von CNF

Der am besten untersuchte CNF ist CNF1. CNF1 deamidiert Glutamin-61 in Rac und Cdc42 bzw. das entsprechende Glutamin-63 in RhoA zu Glutamat. Diese Glutaminreste der kleinen GTPasen sind Glutamin-205 von G_{12} äquivalent und wie bei den heterotrimeren G-Proteinen für die Hydrolyse von GTP entscheidend. Somit führt die Deamidierung zu einer konstitutiven Aktivierung [9].

Als zentrale molekulare Schalter spielen Rho-Proteine eine Rolle bei zellulären Prozessen wie z. B. der Endo- und Exozytose, dem Vesikeltransport, dem Integrin-Signaling und bei der Kontrolle von Transkription und Apoptose. Rho-GTPasen sind aber vor allem als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts bekannt. Durch Aktivierung der Rho-Proteine findet man in Kulturzellen dementsprechend Filopodien (Aktivierung von Cdc42), Lamellipodien (Rac-Aktivierung) und Stressfasern (Rho-Aktivierung). Darüber hinaus werden die Zellen mehrkernig und nach einigen Tagen erfolgt Apoptose.

Ein nur 15 Aminosäuren langes Peptid von RhoA, das die Schalter-2-Region der GTPase umfasst, ist für die Substraterkennung ausreichend und wird von dem Toxin modifiziert. Im Gegensatz zu CNF1 aktiviert CNFY, das von Yersinien gebildet wird, in HeLa-Zellen ausschließlich RhoA. Für die engere Substratspezifität werden Schleifenregionen der katalytischen Domäne verantwortlich gemacht, die um die katalytische Tasche herum angeordnet sind. Obwohl die Deamidierung zu einer konstitutiven Aktivierung der G-Pro-



▲ **Abb. 3:** Vergleich der katalytischen Triaden der deamidierenden Toxine CNF1 (1HQO), PMT (2EBF) und der Transglutaminase Faktor XIII (1GGT). Das katalytisch aktive Histidin wurde übereinandergelegt. Die katalytische Triade von PMT (Cystein, Histidin und Aspartat) gleicht der der Transglutaminase Faktor XIII (Cystein, Histidin und Aspartat), aber kaum der des deamidierenden Toxins CNF1 (Cystein, Histidin und Valin).

teine führt, sind nicht alle nachgeschalteten Signalwege permanent aktiv. So wird das durch CNF aktivierte Rac in der Zelle ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Der Abbau anderer Rho-GTPasen nach der Deamidierung scheint zellabhängig zu sein.

Strukturvergleich

CNFs und PMT benutzen den gleichen Mechanismus, um GTP-bindende Proteine zu aktivieren: CNFs deamidieren ein für die GTP-Hydrolyse essenzielles Glutamin in kleinen Rho-GTPasen, während PMT das entsprechende Glutamin von α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine zu Glutamat umwandelt. Zusätzlich besitzen PMT und CNFs eine auffällige Homologie im N-Terminus, der die Rezeptorbindung und Translokation in eukaryote Zellen vermittelt. Trotz des gleichen Wirkmechanismus haben die aktiven katalytischen Domänen der Toxine keine strukturelle Ähnlichkeit. PMT und CNFs haben die katalytischen Aminosäuren Cystein und Histidin gemeinsam, während die dritte katalytische Aminosäure im Fall von CNFs Valin und im Fall von PMT Aspartat ist. Auch ist die Topografie der katalytischen Triade von PMT (Cystein, Histidin und Aspartat) deutlich verschieden von jener der CNFs (Cystein, Histidin und Valin) (**Abb. 3**); sie ähnelt dagegen der von Papain. Daher wurde zunächst vermutet, dass PMT eine Cysteinprotease ist. Vergleicht man die Struktur von Deamidasen, Cysteinproteasen und Transglutaminasen, findet man einen hohen Grad an Ähnlichkeit. Der Typ der chemischen Reaktion ist in allen Fällen vergleichbar. Transglutaminasen ersetzen die NH_2 -Gruppe des Amids durch eine weitere NH_2 -Gruppe eines

Amins. Deamidasen verwenden dagegen H_2O als Ko-Substrat und ersetzen die NH_2 -Gruppe des Amids durch OH -, was in einer Carboxylgruppe resultiert. Bei Cysteinproteasen findet man die entgegengesetzte Reaktion der Transglutaminasen. Daher ist es kein Widerspruch, dass PMT durch eine Deamidierung heterotrimerer G-Proteine aktiviert, aber eine katalytische Triade ähnlich der von Cysteinproteasen aufweist. Einige Transglutaminasen besitzen die gleiche katalytische Triade wie PMT oder Papain-ähnliche Proteasen. Beispielsweise passen die katalytischen Triaden von PMT und von humanem Faktor XIII perfekt aufeinander. In diesem Zusammenhang muss das Dermonekrotische Toxin (DNT) von *Bordetella parapertussis* erwähnt werden, das Rho-Proteine durch Transglutaminierung an Glutamin-61/63 aktiviert. Dieses Toxin verknüpft Polyamine wie Spermin, Spermidin oder Putrescin mit Glutamin [1]. Es ist von großem Interesse zu klären, welche Struktur das katalytische Zentrum von DNT besitzt.

Deamidierung und Tumorgenese

Die Deamidierung von Rho durch CNFs und von heterotrimeren G-Proteinen durch PMT aktiviert die molekularen Schalter in einer konstitutiven Weise, die einer Mutation von Glutamin zu Glutamat entspricht. In zahlreichen Tumoren kommt eine entsprechende aktivierende Mutation (Glutamin-61) im Onkogenprodukt K-Ras vor. Obwohl Rho-Proteine, die zur Ras-Superfamilie gehören, für die Karzinogenese und Metastasierung von essenzieller Bedeutung sind, wurden kaum Rho-Mutationen gefunden. Bei Rho sind offenbar konstitutiv aktivierte Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs), die die GTPasen

in den aktiven Zustand bringen, wichtiger. Interessanterweise wurde kürzlich in Melanomzellen eine $\text{G}\alpha_q$ -Mutation gefunden, die exakt einer Deamidierung in Glutamin-209, dem Deamidierungs-Zielort von PMT, entspricht [10]. Dieser Befund wird die Diskussion über eine potenzielle Tumorgenese durch die bakteriellen Toxine sicherlich fördern. ■

Literatur

- [1] Hoffmann C, Schmidt G (2004) CNF and DNT. Rev Physiol Biochem Pharmacol 152:49–63
- [2] Kitadokoro K, Kamitani S, Miyazawa M et al. (2007) Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of *Pasteurella multocida* toxin. Proc Natl Acad Sci USA 104:5139–5144
- [3] Buetow L, Flatau G, Chiu K et al. (2001) Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. Nat Struct Biol 8:584–588
- [4] Lax AJ, Pullinger GD, Baldwin MR et al. (2004) The *Pasteurella multocida* toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. Int J Med Microbiol 293:505–512
- [5] Wilson BA, Ho M (2004) *Pasteurella multocida* toxin as a tool for studying G(q) signal transduction. Rev Physiol Biochem Pharmacol 152:93–109
- [6] Zywietz A, Gohla A, Schmelz M et al. (2001) Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. Involvement of Gq but not G11. J Biol Chem 276:3840–3845
- [7] Orth JH, Lang S, Aktories K (2004) Action of *Pasteurella multocida* toxin depends on the helical domain of Galphaq. J Biol Chem 279:34150–34155
- [8] Orth JH, Preuss I, Fester I et al. (2009) *Pasteurella multocida* toxin activation of heterotrimeric G proteins by deamidation. Proc Natl Acad Sci USA 106: 7179–7184
- [9] Schmidt G, Sehr P, Wilm M et al. (1997) Gln63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1. Nature 387:725–729
- [10] Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G et al. (2008) Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. Nature 457:599–602

Korrespondenzadresse:

Dr. Joachim Orth
 Prof. Dr. Gudula Schmidt
 Prof. Dr. Klaus Aktories
 Institut für Experimentelle und Klinische
 Pharmakologie und Toxikologie
 Universität Freiburg
 Albertstraße 25
 D-79104 Freiburg
 Tel.: 0761-2035301
 Fax: 0761-2035311
 Klaus.Aktories@pharmakol.uni-freiburg.de

AUTOREN



Joachim Orth
 1994–1999 Studium der Pharmazie. 2000–2004 Promotion am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg. Seit 2005 Wissenschaftlicher Assistent am selben Institut.



Gudula Schmidt
 1987–1993 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. 1993–1996 Promotion am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund. Seit 1996 tätig am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg. 2001 Habilitation im Fach Pharmakologie und Toxikologie. Seit 2005 APL-Professorin an der Universität Freiburg.



Klaus Aktories
 1969–1972 Studium der Pharmazie, Universität Frankfurt. 1971–1977 Medizinstudium, anschließend Promotion (Dr. med.), Universität Frankfurt. 1981 Promotion (Dr. rer. nat.), 1983 Habilitation im Fach Pharmakologie und Toxikologie, Universität Heidelberg. 1985 C2-Professur, Pharmakologie, Universität Gießen. 1989 C3-Professur, Pharmakologie, Universität Essen. 1991 C4-Professur, Pharmakologie, Universität des Saarlandes. Seit 1995 C4-Professur am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg.