Bakterielle Toxine

Giftspritzen mit einzigartigem Injektionsmechanismus

DANIEL RODERER, STEFAN RAUNSER
ABTEILUNG FÜR STRUKTURBIOCHEMIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE
PHYSIOLOGIE, DORTMUND

Tc (toxin complex) toxins are virulence factors of many insect- and human-pathogenic bacteria. They are composed of three subunits that act together to perforate the host membrane using a syringe-like injection mechanism. Thereby they translocate toxic enzymes into the cell, resulting ultimately in the death of the host cell. Our recent high-resolution structural and functional data explain the mechanism of action of this type of bacterial toxins in molecular detail.

DOI: 10.1007/s12268-019-1081-3
© Die Autoren 2019

Open Access

■ Pathogene Bakterien setzen Virulenzfaktoren frei, um sich an Wirtszellen anzuheften, in diese einzudringen, den Verteidigungsmechanismus des Wirts auszuschalten und die Zellen als Nahrungs- und Überlebensquellen zu erschließen. Zellschädigende Virulenzfaktoren werden als bakterielle Giftstoffe bzw. Toxine bezeichnet.

Ein weitverbreitetes bakterielles Toxin ist der heterotrimer Toxin-Komplex (Tc). Tc-Toxine wurden zuerst in *Photobacterium luminescens* entdeckt, einem insektenpathogenen Proteobakterium, das in Symbiose mit Nematoden lebt. Später wurden Tc-Toxine in weiteren insekten- und humanpathogenen Bak-

◀ **Abb. 1:** Aufbau eines Tc-Toxins. **A**, Kryo-EM-Struktur des Tc-Toxins von *Photobacterium luminescens* (PDB-ID: 6H6E). **B**, atomares Modell eines TcA-Pentamers (PDB-ID: 1VW1). Die einzelnen Domänen eines Protomers sind farblich hervorgehoben. RBD A–D: Rezeptor-bindende Domänen. **C**, atomares Modell eines TcB-TcC-Komplexes (Kokon; PDB-ID: 4O9X). Die hypervariable Domäne (HVR, C-Terminus von TcC), die sich im Inneren des Kokons befindet, ist strukturell nicht aufgelöst.

terien nachgewiesen, darunter *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis*. Die Strukturaufklärung einzelner Untereinheiten und des gesamten Toxin-Komplexes, vor allem mittels Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) kombiniert mit funktionellen Studien, hat zum Verständnis entscheidender Schritte des Wirkmechanismus der Tc-Toxine beigetragen [1].

Tc-Toxine bestehen aus drei Komponenten

Tc-Toxine bestehen aus drei Untereinheiten: TcA, TcB und TcC. Die größte Untereinheit, TcA, ist ein 1,2–1,5 Megadalton großes, flaschenförmiges Homopentamer, das etwa 80 Prozent des Tc-Toxins ausmacht (**Abb. 1A**, [2]). Der N-terminale Bereich von TcA (etwa 2.000 Aminosäuren) formt eine Hülle, die einen zentral verlaufenden, vorgeformten Kanal umgibt. Dieser ist aus den C-terminalen 500 Aminosäuren aufgebaut [2]. Beide Domänen sind über einen etwa 50 Aminosäuren langen Linker miteinander verbunden [3]. Die Hülle besteht aus einer α -helikalen Domäne und einer variablen Anzahl von β -Faltblatt-Domänen, die als Rezeptor-bindende Domänen fungieren (**Abb. 1B**, [3, 4]). Die strukturelle Variabilität dieser Domänen ermöglicht die Bindung von TcA an verschiedene Rezeptoren in der Wirtszellmembran, unter anderem Glykane [5]. Dagegen sind der Linker und der zentrale Kanal hochkonserviert. Diese beiden Domänen ermöglichen die Membranpermeation und Toxintranslokation [6].

Die beiden Untereinheiten TcB und TcC bilden zusammen einen 250 Kildalton großen Kokon (**Abb. 1C**). Eine Seite des Kokons ist von einem β -Propeller verschlossen, der auch die Interaktion mit TcA vermittelt. Eine hyperkonservierte Aspartylprotease-Domäne schließt den Kokon von der anderen Seite ab. Während die Sequenz und Architektur des TcB-TcC-Kokons konserviert sind [3, 4], zeigen die rund 30 Kildalton großen C-terminalen Bereiche unterschiedlicher TcCs kaum Sequenzhomologie. Daher wird dieser Bereich, der das eigentliche toxische Enzym darstellt, hypervariable Domäne (HVR) genannt. Bei *P. luminescens* ist die toxische Aktivität von zwei HVRs bekannt. In beiden Fällen handelt es sich um ADP-Ribosyltransferasen, die

entweder Aktin oder Rho-GTPasen modifizieren und dadurch intrazelluläre Aktinaggregation verursachen, was zum Zelltod führt [7]. Die jeweilige HVR wird von der Aspartylprotease-Domäne von TcC autokatalytisch abgetrennt und bleibt im Kokon eingeschlossen, bis dieser an TcA bindet [3, 8].

Tc-Toxin-Aktivierung durch Entfaltung und Neufaltung

Ein wichtiger Schritt zur Aktivierung des Tc-Toxins ist die Bindung des TcB-TcC-Kokons an TcA. Die TcB-Bindedomäne von TcA ist ein fünffach symmetrischer Trichter. Die TcA-Bindedomäne von TcB hingegen formt einen asymmetrischen sechsblättrigen β -Propeller, bei dem zwei Blätter nach innen gefaltet sind und den Kokon dadurch verschließen (**Abb. 2A**, [3]). Die Bindung des β -Propellers an TcA induziert durch den Zusammenstoß zweier Sensorschleifen in den Bindedomänen von TcA und TcB die strukturelle Umorganisation des β -Propellers [9]. Die beiden vormals geschlossenen, asymmetrischen Blätter des β -Propellers nehmen nun eine offene, sechsfach pseudosymmetrische Konformation ein (**Abb. 2B**) und interagieren mit dem pentameren TcA. Trotz des Symmetrieunterschieds ist die TcA-TcB-Interaktion hochaffin mit einer subnanomolaren Dissoziationskonstante [9].

Ein direkter Übergang von der geschlossenen zur offenen β -Propeller-Konformation ist sterisch nicht möglich. Anhand strukturbasierter Moleküldynamik(MD)-Simulationen zeigten wir, dass sich bei der Bindung an TcA beide geschlossenen Blätter des β -Propellers nacheinander entfalten und sich danach in die offene Form zurückfalten (**Abb. 2C**, [9]).

Interessanterweise hat ein leerer TcB-TcC-Kokon ohne eingeschlossene HVR eine um drei Größenordnungen verringerte Affinität zu TcA. Das bedeutet, dass die HVR die geschlossene Form des β -Propellers destabilisiert und dadurch an der Einleitung des Konformationsübergangs vom geschlossenen zum offenen β -Propeller beteiligt ist [9].

Die Öffnung des Propellers bewirkt, dass die HVR, also das toxische Enzym, aus dem Kokon in den Translokationskanal von TcA einwandert. Dies geschieht auch in einer TcC-Variante, bei

▲ **Abb. 2:** Mechanismus der Toxinassemblierung. Vor der Bindung von TcB-TcC an TcA ist der β -Propeller von TcB geschlossen (A), danach geöffnet (B). C, durch MD-Simulationen berechnete β -Propeller-Strukturen, die Zwischenstufen während des Öffnungsprozesses darstellen. D, Vergleich der hypervariablen Domäne (HVR) im Translokationskanal des assemblierten Toxins beim Wildtyp (links) und einer Aspartylprotease-defizienten TcC-Variante (rechts).

der der N-Terminus des Enzyms an die Aspartylprotease-Domäne gebunden bleibt (**Abb. 2D**). Somit wird deutlich, dass das toxische Enzym, anders als beim Anthrax-Toxin oder bei AAA⁺-ATPasen, mit dem C-Terminus voran transloziert wird [9].

Membraninsertion und Toxintranslokation

Von dem Bakterium sekretiert, bindet der Tc-Toxinkomplex mittels seiner Rezeptor-bindenden Domänen an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Wirtszelle. Dies führt zur Endocytose. Im späten Endosom kommt es dann zu einer Ansäuerung, was die elektrostatischen Wechselwirkungen, die die Hülle zusammenhalten, schwächt [3]. Die Hülle öffnet sich, und der Kanal wird durch die Kontraktion der Linkerdomäne nach unten geschoben und dringt in die Membran ein (**Abb. 3A, B**, [6]). In der Präporenform, also vor der Membraninsertion, ist der Linker beinahe über die gesamte Länge von TcA gestreckt.

Dagegen nimmt er in der Pore eine kompakte Form in einer Bindetasche zwischen Hülle und Kanal ein (**Abb. 3B**). MD-Simulationen zeigten, dass die bei der Kontraktion der fünf Linker im Pentamer frei werdende Energie von etwa 55 kcal/mol ausreicht, um die Energiebarriere für die Membraninsertion (rund 36 kcal/mol) zu überwinden [6]. Dieser einzigartige Mechanismus wurde bis jetzt nur in Tc-Toxinen beschrieben. Wie der Linker anfangs gespannt wird, ist noch nicht erforscht.

Die hydrophobe Umgebung der Membran bewirkt, dass sich der zuvor geschlossene Kanal an der Spitze öffnet (**Abb. 3C**, [6]). Einzelne Lipidkopfgruppen lagern sich transient zwischen die Schleifen an den Kanalenden der Protomere ein

▲ **Abb. 3:** Vergleich zwischen Präpore (jeweils links) und Pore (jeweils rechts). A, Oberflächendarstellung der Pentamere. In der Porenstruktur ist der Transmembranbereich in eine Lipid-Nanodisc (grau-transparent) eingebettet. B, Atommodell jeweils eines Protomers. C, Atommodell der Kanalspitze. D, Übersicht des Intoxikationsmechanismus des Tc-Toxins. HVR: hypervariablen Domäne.

und ziehen die Spitze des Kanals auf. Fünf in der Präpore unterbrochene α -Helices schwingen nach außen und formen durchgängige Transmembranhelices. Durch den nun offenen Kanal kann das toxische Enzym schlussendlich in das Cytoplasma der Zielzelle eingeschleust werden [10]. Dort modifiziert es als finalen Schritt der Intoxikation das jeweilige Zielprotein [7], was den Zelltod zur Folge hat (**Abb. 3D**).

Potenzieller Einsatz als Pflanzenschutzmittel

Das Verständnis wichtiger Schritte im Funktionsmechanismus von Tc-Toxinen bildet die Grundlage für deren potenziellen Einsatz als Bioinsektizid. Der Assemblierungs- und Membranpenetrationsmechanismus ist konserviert, somit besteht die Möglichkeit, verschiedene Komponenten von verschiedenen Organismen zu maßgeschneiderten Tc-Toxinen zu kombinieren. Alleine *P. luminescens* hat bis zu fünf verschiedene TcAs und sieben verschiedene TcCs; somit gibt es eine große Zahl an theoretisch möglichen Komplexen. Die Aufklärung von Rezeptor-Toxin-Interaktionen wird in Zukunft eine weitere Grundlage für die Auswahl von Tc-Komponenten gegen bestimmte Schädlinge bilden.

Danksagung

Ein großer Dank geht an alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung, die an diesem Projekt über die letzten acht Jahre gearbeitet haben. Die Forschung wurde finanziell von der Max-Planck-Gesellschaft und einem ERC *Consolidator Grant* (FP7/2007-2013) gefördert. ■

Literatur

- [1] Roderer D, Raunser S (2019) Tc toxin complexes: assembly, membrane permeation, and protein translocation. *Annu Rev Microbiol* 73, doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095531
- [2] Gatsogiannis C, Lang AE, Meusch D et al. (2013) A syringe-like injection mechanism in *Photorhabdus luminescens* toxins. *Nature* 495:520–523
- [3] Meusch D, Gatsogiannis C, Efremov RG et al. (2014) Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature* 508:61–65
- [4] Leidreiter F, Roderer D, Meusch D et al. (2019) Conserved architecture of Tc toxins from human and insect pathogenic bacteria. *bioRxiv* 596536, doi: 10.1101/596536
- [5] Piper SJ, Lou Brillault, Rothnagel R et al. (2019) Cryo-EM structures of the pore-forming A subunit from the *Yersinia entomophaga* ABC toxin. *Nat Commun* 10:1952
- [6] Gatsogiannis C, Merino F, Prumbaum D et al. (2016) Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail. *Nat Struct Mol Biol* 23:884–890
- [7] Lang AE, Schmidt G, Schlosser A et al. (2010) *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science* 327:1139–1142

- [8] Busby JN, Panjikar S, Landsberg MJ et al. (2013) The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device. *Nature* 501:547–550
- [9] Gatsogiannis C, Merino F, Roderer D et al. (2018) Tc toxin activation requires unfolding and refolding of a β -propeller. *Nature* 563:209–213
- [10] Roderer D, Hofnagel O, Benz R et al. (2019) Structure of a Tc holotoxin pore provides insights into the translocation mechanism. *bioRxiv* 7:590430, doi: 10.1101/590430

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Open access funding provided by Max Planck Society.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Stefan Raunser
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Strukturbiochemie
Otto-Hahn-Straße 11
D-44227 Dortmund
Tel.: 0231-133-2300
raunser@mpi-dortmund.mpg.de
<https://www.mpi-dortmund.mpg.de/forschungsgruppen/raunser>

AUTOREN

Daniel Roderer (links) und Stefan Raunser

Stefan Raunser

1995–2000 Biologie- und Chemiestudium, Universität Mainz. 2001–2004 Promotion, Max-Planck-Institut (MPI) für Biophysik. 2005–2008 Postdoc, Harvard Medical School, USA. 2008–2013 Emmy-Noether-Gruppenleiter, MPI für molekulare Physiologie. 2014 Einstein-Professor für Membranbiochemie, FU Berlin. Seit 2014 Direktor am MPI für molekulare Physiologie. Seit 2015 außerplanmäßiger Professor, TU Dortmund, und Honorarprofessor, Universität Duisburg-Essen.

Daniel Roderer

2004–2009 Biologiestudium an der Universität Regensburg. 2009–2014 Promotion an der ETH Zürich am Institut für Biophysik, danach bis 2015 Postdoc unter der Leitung von Prof. Dr. R. Glockshuber. Seit 2015 Postdoc am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie unter der Leitung von Prof. Dr. S. Raunser.