

Kleb's zusammen & zerleg's: Detergensproteine in der zelleigenen Immunität

Miriam Kutsch

Article - Version of Record



Suggested Citation:

Kutsch, M. (2024). Kleb's zusammen & zerleg's: Detergensproteine in der zelleigenen Immunität. *Biospektrum*, 30(2), 162–164. <https://doi.org/10.1007/s12268-024-2147-4>

Wissen, wo das Wissen ist.

This version is available at:

URN: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:061-20241127-125327-1>

Terms of Use:

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

For more information see: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Guanylat-bindende Proteine

Kleb's zusammen & zerleg's: Detergensproteine in der zelleigenen Immunität

MIRIAM KUTSCH
INSTITUT FÜR MOLEKULARE PATHOGENITÄT, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

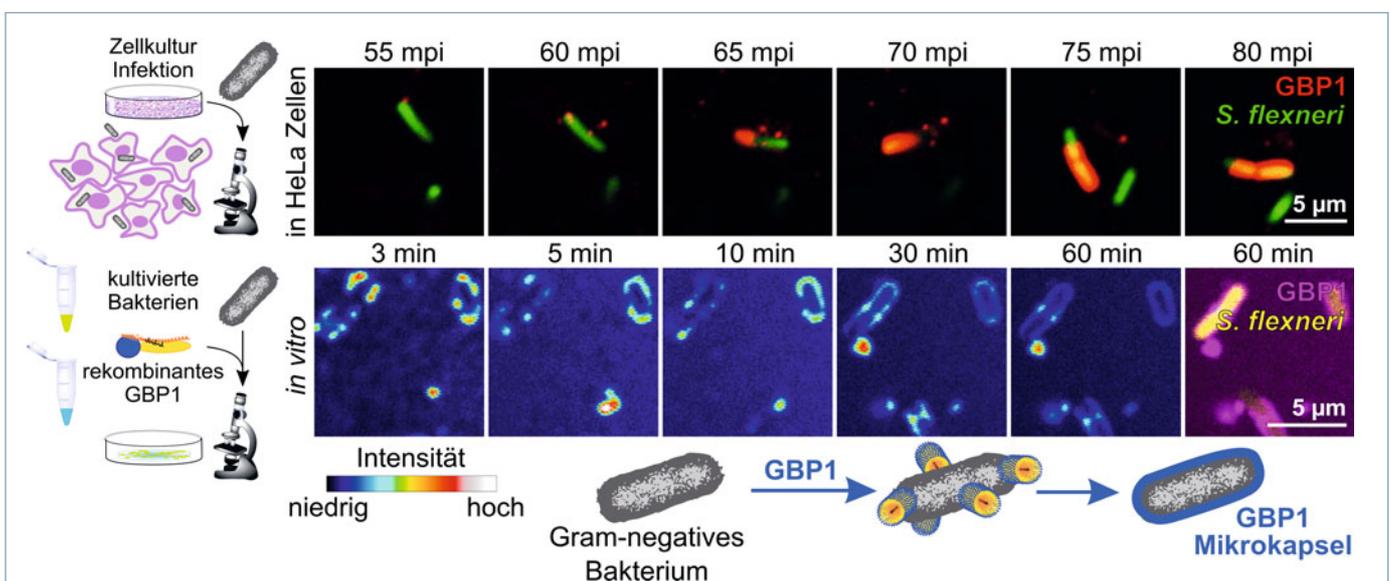
The spread of antibiotic resistances among bacteria led to an increase in multidrug resistant pathogens. New therapies are urgently needed to tackle the current global antibiotic crisis. One strategy is to boost the ancient antimicrobial defense conserved in all vertebrates: the innate immune system. To develop such therapies, a fundamental understanding of host-pathogen interactions is crucial. We study how detergent-like host factors combat bacterial pathogens in cell-autonomous immunity.

DOI: 10.1007/s12268-024-2147-4
© Die Autorin 2024

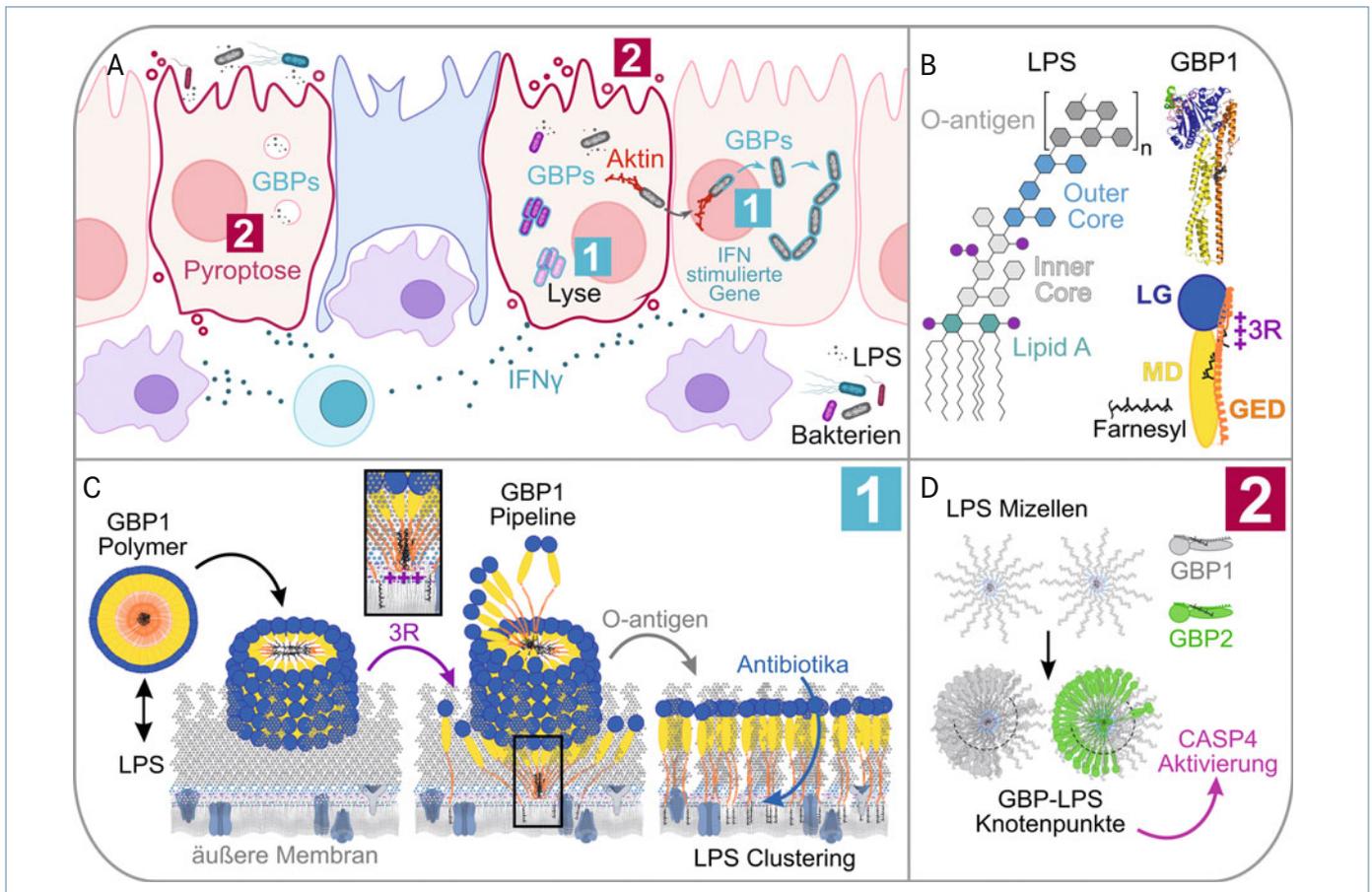
Die Behandlung von bakteriellen Infektionen mit Antibiotika hat die moderne Medizin grundlegend verändert und ist oft lebensrettend. Massiver und unsachgemäßer Antibiotikaeinsatz treibt jedoch die Ausbreitung von Resistenzen gegen verfügbare Medikamente voran. Da sich die Entdeckung von neuen wirksamen Antibiotika-

klassen als schwierig gestaltet, stellt die stetig steigende Anzahl an multiresistenten bakteriellen Pathogenen eine globale Bedrohung dar. Um diese aktuelle Gesundheitskrise zu bewältigen, sind innovative Ansätze zur Behandlung von Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien dringend notwendig.

Gehen wir aber einen Schritt zurück. Warum sind wir auf Antibiotika angewiesen? Was hält die abertausenden Mikroorganismen, denen wir zum einen täglich in der Umwelt begegnen und mit denen wir in Symbiose leben wie die Hautflora oder Darmbakterien, davon ab, aus der Reihe zu tanzen und Krankheiten zu verursachen? Tatsächlich werden diese Mikroben mit mehreren wirts-eigenen antimikrobiellen Mitteln in Schach gehalten – nämlich mit den zellulären und molekularen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Eine vielversprechende Strategie multiresistente Bakterien zu bekämpfen besteht darin, Immunantworten, die gezielt bakterielle Schutzmechanismen und Virulenzfaktoren angreifen, zu verstärken, um Krankheitserreger für verfügbare Antibiotika zu resensibilisieren. Die Entwicklung solcher neuartigen Therapien erfordert ein detailliertes mechanistisches Verständnis von Wirt-Pathogen-Interaktionen. Ziel unserer Forschung ist es, die Wechselwirkungen zwischen medizinisch relevanten bakteriellen Krankheitserregern und einem zentralen



▲ Abb. 1: *In vitro*-Systeme rekonstruieren Wirts-Pathogen-Interaktionen. Zeitaufgelöste konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigt, wie mCherry-gelabeltes GBP1 mit GFP-exprimierenden Shigellen in einer infizierten Epithelzelle ko-lokalisiert. Die biochemische Rekonstruktion mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten, rekombinanten Protein und kultivierten Bakterien enthüllte, dass GBP1-Polymere direkt an die Oberfläche von Gram-negativen Bakterien binden und einen antimikrobiellen Proteinmantel bilden.



▲ **Abb. 2:** GBPs erfüllen zwei Funktionen in der zelleigenen Immunität gegen bakterielle Pathogene. **A,** Interferon-induzierte GBPs vermitteln Pyroptose, helfen bei Lysieren von Bakterien, und blockieren Bildung von Aktinschweifeln. **B,** Struktur und Schemata von LPS und GBP1. **C,** Unsere mechanistischen Studien zeigten, dass GBP1 als LPS-Detergens agiert und die Barrierefunktion der bakteriellen äußeren Membran aufrichtet. **D,** Zudem kleben GBP1 und GBP2 LPS-Mizellen zu GBP-LPS-Aggregaten zusammen, die als Knotenpunkt für CASP4-Aktivierung dienen.

Zweig des angeborenen Immunsystems, der zelleigenen Immunität, grundlegend zu verstehen.

Schlüsselproteine in der zelleigenen Immunität

Zelleigene Immunität beschreibt die Fähigkeit einer einzelnen Wirtszelle, sich gegen intrazelluläre Viren, Protozoen und Bakterien zur Wehr zu setzen. Um gezielt gegen mikrobielle Eindringlinge vorzugehen, muss das Immunsystem in der Lage sein, „selbst“ von „nicht selbst“ zu unterscheiden. Dies geschieht durch eine Vielzahl von extrazellulären und intrazellulären Immunsensoren, die konservierte mikrobielle Moleküle wie das Lipopolysaccharid (LPS) auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien erkennen. Das amphiphile LPS bildet mit Glycerophospholipiden eine asymmetrische Lipiddoppelschicht: die äußere Membran. LPS ist nicht nur einer der Hauptbestandteile der Hülle Gram-negativer Bakterien, sondern wird von Bakterien auch aktiv auf Äußere-Membran-

Vesikeln in die Umgebung abgegeben und bei Schäden der bakteriellen Membran freigesetzt, was zur Bildung löslicher LPS-Mizellen führt.

Während das Transmembranprotein Toll-like-Rezeptor 4 extrazelluläres und endozytisiertes LPS detektiert, wird LPS im Zytosol der Wirtszelle vom LPS-Rezeptor Caspase-4 (CASP4) erkannt. Nach Aktivierung durch LPS bildet CASP4 das nicht kanonische Inflammasom, was programmierten Zelltod sowie die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen initiiert. Der entzündliche Zelltod Pyroptose entzieht intrazellulären Bakterien nicht nur ihre Replikationsnische, sondern lockt auch professionelle Immunzellen an den Infektionsherd. Diese Immunzellen greifen extrazelluläre Mikroben entweder direkt an oder alarmieren benachbarte Wirtszellen, indem sie zusätzliche Zytokine wie Interferone freisetzen und so die Expression von Hunderten antimikrobieller Proteine induzieren, was eine schnelle zelleigene Immunantwort gegen eindrin-

gende Bakterien ermöglicht. Hauptakteure der zellautonomen Immunität sind eine Gruppe von Interferon-induzierbaren großen GTPasen, die Guanylat-bindenden Proteine (GBPs) [1].

Infektionsstudien in Zellkultursystemen und *in vivo*-Mausmodellen haben in den letzten Jahrzehnten gezeigt, dass GBPs nicht nur die Verbreitung von Viren, Protozoen und Bakterien blockieren, sondern auch Entzündungsreaktionen fördern und so dazu beitragen, mikrobielle Infektionen effizient einzudämmen. Parallel dazu haben zellfreie *in vitro*-Studien und Strukturanalysen entschlüsselt, wie GBPs die Hydrolyse von Guanin-5'-triphosphat (GTP) zu Guanin-Di- und -monophosphat katalysieren, sich selbst zu Dimeren, Oligomeren und Polymeren zusammenlagern und an symmetrische Lipiddoppelschichten binden [1]. Obwohl die zwei Forschungsstränge wichtige Erkenntnisse lieferten und die Grundlagen für alle nachfolgenden Arbeiten bildeten, hatten beide ihre Einschränkungen: Während der biochemi-

schen und biophysikalischen Charakterisierung von GBPs meist die unmittelbare biologische Relevanz fehlte, mangelte es Zellkultur- und Tierstudien im Allgemeinen an einem tieferen mechanistischen Verständnis der GBP-vermittelten Immunantworten. Um diese Limitierungen zu überwinden, kombinieren wir biochemische, mikrobiologische, immunologische und zellbiologische Ansätze, um in zellfreien und zellbasierten Systemen Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen zu studieren. Das erlaubt uns, GBP-vermittelte zelleigene Immunität gegen krankheitsverursachende enterische Gram-negative Bakterien auf einem molekularen Level zu verstehen.

Zytosolische Detergens-Proteine resensibilisieren bakterielle Membranen und fördern Entzündungen

In der Immunabwehr gegen intrazelluläre Bakterien nimmt das humane GBP1 eine Schlüsselrolle ein. Kürzlich haben wir und andere entdeckt, dass GBP1 ein LPS-bindendes Protein ist [2, 3]. Mit biochemischen Rekonstruktionen haben wir demonstriert, dass polymeres GBP1 direkt an die Oberfläche von Gram-negativen Darmpathogenen wie *Shigella flexneri* und *Salmonella enterica* typhimurium in infizierten Epithelzellen bindet und die Bakterien in einen antibakteriellen Proteinmantel, die GBP1-Mikrokapsel, hüllt (Abb. 1, [2]). Unsere interdisziplinären Studien haben zudem entschlüsselt, dass GBP1 ein molekularer Kleber ist und membranständiges und lösliches LPS bündelt. Die Identifizierung von GBP1 als LPS-Detergens erlaubte es uns, zwei zuvor beobachtete zelleigene Immunantworten mechanistisch zu erklären, nämlich wie GBP1 zytosolische Bakterien direkt angreift, um Aktin-basierte Fortbewegung zu unterdrücken und bakterielle Lyse hervorzurufen, und wie GBPs CASP4-abhängige Pyroptose beschleunigen, um intrazelluläre Krankheitserreger aus ihrer Replikationsnische zu entfernen und Entzündungssignale auszusenden (Abb. 2, [2, 4]). Wir fanden heraus, dass GBP1 die Barrierefunktion der äußeren Membran aufbricht und damit resistente bakteriellen Pathogene für das Reserveantibiotikum Polymyxin B resensibilisiert. Diese Daten lieferten den ersten Beweis dafür, dass GBP1 synergistisch mit Antibiotika wirkt, um Bakterien abzutöten. Eine kürzlich durchgeführte Studie bestätigte unsere Entdeckung und fand heraus, dass der Interferon-induzierte Wirtsabwehrfaktor Apolipoprotein 3 in der

Lage ist, Bakterien im Zytosol infizierter Zellen abzutöten, wenn diese zuvor mit GBP1 eingekapselt wurden [5]. Zudem konnten wir zeigen, dass die GBP1-Mikrokapsel die Funktion des wichtigen Virulenzfaktors IcsA stört [2]. IcsA ist in der äußeren Membran des Humanpathogens *Shigella flexneri* eingebettet und stimuliert Aktinpolymerisation an einem der bakteriellen Pole, was zur Ausbildung von sogenannten Aktinschweif führt, die von Shigellen genutzt werden, um sich innerhalb der Wirtszelle und zwischen Wirtszellen fortzubewegen. Da GBP1 die Integrität der äußeren Membran zerstört und damit die polare Lokalisation von IcsA beeinträchtigt, sind mit GBP1 ummantelte Shigellen nicht mehr in der Lage, Aktinschweife auszubilden.

Um Bakterien zu immobilisieren und zu töten, ist die direkte Interaktion von GBP1 mit der bakteriellen Membran essenziell. Überraschenderweise ist die Bindung an die Bakterienoberfläche für die GBP-vermittelte nicht kanonische Inflammation-Aktivierung entbehrlich. Ausschlaggebend ist hier, dass polymerisierendes GBP1 lösliche LPS-Mizellen zu größeren Strukturen aggregiert (Abb. 2, [2, 4]). Dies konnten wir in Zellkulturstudien zeigen, in denen wir ein Set an biochemisch gut charakterisierten GBP1-Mutanten einsetzten, die es uns erlaubten zu testen, ob GTP-Hydrolyse, Polymerisierung, Membranbindung und LPS-Zusammenkleben für biologische GBP1-Funktionen wichtig sind. Hierzu wurden mit CRISPR/CASP9 generierte GBP1-Knockout-Zelllinien, die entweder Wildtyp GBP1 oder aber die GBP1-Mutanten exprimieren, mit LPS stimuliert und Pyroptosemerkmale wie Zelltod und Sekretion von Zytokinen über die Zeit verfolgt. Wegweisend in diesen Studien war die 3R-GBP1-Mutante, die zwar LPS bündelt, Bakterien aber nicht einkapseln kann und trotzdem in der Lage ist, den Verlust von Wildtyp GBP1 auszugleichen. Wir haben zudem humanes GBP2 als zweites zytosolisches LPS-Detergens identifiziert, das ebenfalls in der Lage ist, Pyroptose zu beschleunigen [4].

In *in vitro*-Experimenten konnten wir schließlich mit rekombinantem Protein und isoliertem LPS rekonstruieren, dass GBP1 und GBP2 LPS zu GBP-LPS-Aggregaten zusammenkleben, die als Knotenpunkte für CASP4-Aktivierung fungieren, was einen neuen mechanistischen Rahmen für die nicht kanonische Inflammation lieferte.

Unsere mechanistischen Arbeiten haben gezeigt, dass GBPs zwei unabhängige Funktionen in der zelleigenen Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien ausführen: Zum einen greift GBP1 die Hülle von zytosolischen Pathogenen direkt an, zum anderen dienen GBPs als Immunsensoren, die Entzündungsreaktionen beschleunigen. Beides macht GBPs zu interessanten Ziel-Proteinen für neuartige Therapien gegen Infektionen mit antibiotikaresistenten bakteriellen Pathogenen. ■

Literatur

- [1] Kutsch M, Coers J (2020) Human guanylate binding proteins: nanomachines orchestrating host defense. *FEBS J* 288: 5826–5849
- [2] Kutsch M, Sistemich L, Lesser CF et al. (2020) Direct binding of polymeric GBP1 to LPS disrupts bacterial cell envelope functions. *EMBO J* 39: e104926
- [3] Santos JC, Boucher D, Schneider LK et al. (2020) Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria. *Nat Commun* 11: 3276
- [4] Dickinson MS, Kutsch M, Sistemich L et al. (2023) LPS-aggregating proteins GBP1 and GBP2 are each sufficient to enhance caspase-4 activation both in cellulo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 120: e2216028120
- [5] Gaudet RG, Zhu S, Halder A et al. (2021) A human apolipoprotein L with detergent-like activity kills intracellular pathogens. *Science* 373: eabf8113

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Miriam Kutsch
Institut für Molekulare Pathogenität
Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Universitätsstraße 1
D-40225 Düsseldorf
miriam.kutsch@hhu.de

AUTORIN



Miriam Kutsch

2011–2013 Masterstudium Biochemie, Schwerpunkt Biomolekulare Chemie, an der Ruhr-Universität Bochum. 2017 Promotion bei Prof. Dr. C. Herrmann an der Ruhr-Universität Bochum. 2018–2023 Postdoc bei Prof. Dr. J. Coers an der Duke University, NC, USA, als DFG-Stipendiatin. 2023 Nachwuchsgruppenleiterin an der Universität Düsseldorf, finanziert durch das NRW-Rückkehrprogramm. Seit 2023 Institutsleiterin der Molekularen Pathogenität, Universität Düsseldorf.