



Thomas Wollert

Jahrgang 1979. 1998–2002 Studium der Biochemie an der Universität Potsdam. 2002–2004 Studium der Biochemie an der Universität Hannover. 2004–2007 Promotion im Bereich Strukturbiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Seit 2008

Postdoc am National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, USA.

Bayer Schering Pharma-Promotionspreis der GBM

Veränderung der Wirtsspezifität von *Listeria monocytogenes* durch rationales Protein-Design

THOMAS WOLLERT

LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY, NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, BETHESDA, USA

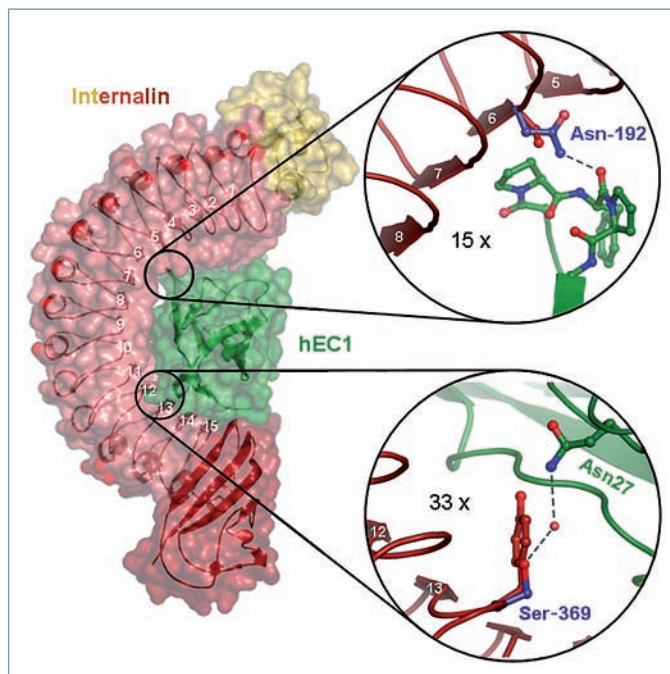
Das humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* verursacht vor allem bei immungeschwächten Menschen und Schwangeren schwerwiegende Infektionen, die mit Meningitis, Sepsis oder Fehlgeburten einhergehen können. Trotz gezielter Antibiotika-Therapie endet diese als Listeriose bezeichnete schwere Form der Infektion in 30 Prozent aller Fälle tödlich. Verantwortlich für die schlechte Therapierbarkeit und hohe Mortalität der Listeriose ist die Fähigkeit des Keims, seine eigene Aufnahme in normalerweise nicht phagozytisch aktive Zellen des Wirts zu induzieren. *L. monocytogenes* wird zumeist mit verdorbenen Lebensmitteln aufgenommen. Nach Passage des sauren Milieus des Magens gelangt das Bakterium in den Darm, wo es die eigene Phagozytose in Epithelzellen der Darmmukosa erzwingt und somit diesen als intestinale Barriere bezeichneten Schutzwall durchbricht. Das listerielle Oberflächenprotein Internalin (InlA) spielt dabei eine entscheidende Rolle. Es erkennt und bindet das von humanen Epithelzellen exprimierte Adhäsionsprotein E-Cadherin. Durch die hohe Dichte von InlA-Molekülen auf der bakteriellen Oberfläche zum einen und von E-Cadherin-Molekülen auf der epithelialen Oberfläche zum anderen, stülpt sich die epitheliale Membran um das Bakterium. *L. monocytogenes* lysiert die so gebildete phagosomale Membran und befindet sich schließlich im Zytoplasma der Wirtszelle^[1].

Der Komplex zwischen funktionellen Domänen von InlA und E-Cadherin konnte strukturell aufgeklärt werden^[2] (Abb. 1). InlA gehört der Familie der *leucine-rich repeat* (LRR)-Proteine an. Die extrazelluläre Domäne des E-Cadherins besteht aus fünf Ig-ähnlichen Domänen, von denen nur die N-terminale (hEC1) an der Interaktion mit InlA beteiligt ist. Trotz einer überdurchschnittlich großen apparenten Interaktionsfläche ist die Bindungsaffinität beider Proteine überraschend gering ($K_D = 8 \mu\text{M}$). Dies führt dazu, dass Aminosäure-Substitutionen in der Interaktionsfläche zu InlA, wie sie in homologen E-Cadherin-Molekülen anderer Spezies zu finden sind, diese Interaktion verhindern können. Konsequenz dieser Bindungsspezifität von InlA ist eine Wirtsspezifität des Bakteriums, da es ohne funktionsfähiges InlA nicht in der Lage ist, die intestinale Barriere des potenziellen Wirts zu überwinden. Mäuse sind beispielsweise gegen listerielle Infektionen resistent. Ein Tiermodell zur infektionsbiologischen Untersuchung der humanen Listeriose steht somit nicht zur Verfügung.

Könnte die Bindungsaffinität von InlA zu humanem E-Cadherin erhöht und somit eine Erkennung auch von murinem E-Cadherin ermöglicht werden, bestünde die Hoffnung, ein funktionsfähiges Infektionsmodell in der Maus etablieren zu können. Das Ziel unserer Arbeit war somit eine Verstärkung der Affinität von InlA zu seinem humanen

Rezeptor E-Cadherin. Die hochauflösende Komplexstruktur ermöglichte einen rationalen Optimierungsansatz^[3]. Beide Proteine weisen eine makroskopisch gute Komplementarität auf. In der Tat befinden sich jedoch überdurchschnittlich viele Wassermoleküle zwischen beiden Proteinen, was auf eine mikroskopisch geringe Komplementarität schließen lässt. Im sechsten LRR von InlA befindet sich beispielsweise Serin-192, das eine über

Wasser vermittelte Interaktion mit dem Rückgrad des E-Cadherin eingeht. Durch den Austausch des Serins gegen eine etwas längere Seitenkette, wie sie Asparagin besitzt, so die Hypothese, könnte die Lücke zwischen beiden Proteinen geschlossen und eine direkte Wasserstoffbrücke zum E-Cadherin ausgebildet werden. In der Tat ergab die röntgenkristallografische Analyse des InlA^{Ser192Asn}/hEC1-Komplexes, dass Asn-192 direkt mit hEC1



▲ **Abb. 1:** Strukturen des Internalin(InlA)/hEC1-Komplexes und der InlA-Varianten mit erhöhter Affinität zu hEC1. InlA (gelb: Cap-, hellrot: LRR-, dunkelrot: Interrepeat-Domäne) erkennt mit seiner LRR-Domäne spezifisch die N-terminale Ig-ähnliche Domäne des humanen E-Cadherins (hEC1). Die Detailabbildungen zeigen strukturelle Änderungen in den InlA-Varianten. Die Substitution von Ser-192 durch Asparagin (oben) führt zur Ausbildung einer direkten Wasserstoffbrückenbindung zu hEC1, der Austausch des Tyr-369 gegen Serin (unten) ersetzt eine sterisch ungünstige Interaktion mit Asn-27 des hEC1 durch eine wasservermittelte Wasserstoffbrücke.

wechselwirkt (**Abb. 1**) und ein Wassermolekül aus der Interaktionsfläche ausgeschlossen wurde. Die Bindungsaffinität dieser InlA-Variante zu hEC1 war 15-fach erhöht. Ein weiteres Beispiel findet sich im 13. LRR des InlA. Ein Tyrosin kommt hier Asn-27 des E-Cadherins zu nahe. Diese ungünstige Interaktion wurde beseitigt, indem das zu große Tyrosin gegen das kleinere Serin ausgetauscht wurde. Die InlA^{Tyr369Ser}-Variante weist, verglichen mit Wildtyp-InlA, tatsächlich eine 33-fach höhere Bindungsaffinität zu hEC1 auf. Beide Substitutionen isoliert, erhöhen die Bindungsaffinität von InlA zu E-Cadherin schon erheblich. Was geschieht jedoch bei deren Kombination? Erstaunlicherweise besitzt die InlA^{Ser192Asn-Tyr369Ser}-Variante eine 2.500-fach erhöhte Affinität zu hEC1 ($K_D = 1 \text{ nM}$). Die Interaktion beider Proteine ist somit fester als die hochaffiner Antikörper mit ihren Antigenen.

Zudem erkennt die InlA^{Ser192Asn-Tyr369Ser}-Variante murines E-Cadherin mit einer Affinität ($K_D = 10 \mu\text{M}$), die der des InlA/hEC1-Komplexes gleicht. Führt man beide Mutationen genomisch in *inlA* von *L. monocytogenes* ein, entsteht ein Stamm, der das hochaffine InlA^{Ser192Asn-Tyr369Ser} exprimiert. In der Tat ist dieser Stamm im Gegensatz zu den unveränderten Bakterien in der Lage, Mäuse zu infizieren^[4]. Histologische Untersuchungen zeigten, dass die veränderten Bakterien die Darmbarriere der Maus effizient überwinden können und somit eine systemische Infektion herbeiführen, die symptomatisch mit der des Menschen vergleichbar ist.

Durch rationale, anhand der Kristallstruktur des Komplexes von InlA und hEC1 identifizierte Veränderungen des Invasionsproteins InlA ist es gelungen, ein universelles Infektionsmodell der humanen Listeriose in der Maus zu schaffen.

Zudem konnte das erste Mal der Wirtswechsel eines Pathogens, wie er in der Vergangenheit gerade bei viralen Krankheitserregern häufig vorgekommen ist, dokumentiert und der Mechanismus untersucht werden. Geringe Veränderungen von Virulenzfaktoren, wie sie durch spontane Mutation entstehen können, genügen offensichtlich, um einen Wirtswechsel herbeizuführen. Beispielsweise konnten sich der AIDS-Erreger HIV, das Influenza-Virus und das SARS-Coronavirus durch minimale Veränderungen in Virulenzfaktoren an den Menschen anpassen und globale Pandemien auslösen. ■

Literatur

- [1] Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. (2006): *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 423–434.
- [2] Schubert, W. D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., Heinz, D. W. (2002): Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 111: 825–836.
- [3] Wollert, T., Heinz, D. W., Schubert, W.-D. (2007): Thermodynamically re-engineering the listerial invasion complex InlA / E-Cadherin. *PNAS* 104 (35): 13960–13965.
- [4] Wollert, T., Pasche, B., Rochon, M., Deppenmeier, S., van den Heuvel, J., Gruber, A. D., Heinz, D. W., Lengeling, A., Schubert, W.-D. (2007): Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 129: 801–902.

Korrespondenzadresse:

Dr. Thomas Wollert
 Laboratory of Molecular Biology
 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
 National Institutes of Health
 MSC 0580, Bldg. 50 Rm. 4517
 50 South Drive
 Bethesda, Maryland
 20892, USA
 Tel.: +1-301-402-4703
 Fax: +1-301-480-0639
 wollertt@nidk.nih.gov