

Killertoxine

Killerplasmid-codierte Ribotoxin-RNasen aus Hefen

ROLAND KLASSEN, RAFFAEL SCHAFFRATH
INSTITUT FÜR BIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT KASSEL

Certain yeasts produce toxins encoded by cytoplasmic killer plasmids and kill sibling cells which have lost the killer system. Those retaining it, survive due to an immunity gene. This selection regime is at risk when cytoplasmic DNA is captured in the nucleus, but the killer plasmids have prepared for this via an unusually high A/T bias. In case of nuclear immunity gene transcription, the polyadenylation system recognizes A/T-rich motifs, cleaves the mRNA and prevents immunity expression.

DOI: 10.1007/s12268-016-0649-4
© Springer-Verlag 2016

Killerhefen

■ Aus menschlicher Sicht lassen sich Hefen in Gut und Böse einteilen. Zum einen sind sie unverzichtbar für die Produktion von Brot und Wein (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*), zum anderen gehören auch gefährliche Pathogene (z. B. *Candida albicans*) zu dieser Pilzgruppe. Auch untereinander leben die einzelligen Eukaryoten nicht nur in friedlicher Koexistenz: Viele Hefen produzieren Toxine, die andere Hefearten oder sogar nicht-identische Varianten der gleichen Art töten. Ein gut untersuchtes Beispiel für den letzten Fall stellt das Killertoxin von *Kluyveromyces lactis* dar [1, 2]. Dieses auch als Zymocin bekannte Toxin ist nicht im Zellkern, sondern auf linearen DNA-Molekülen (auch Killerplasmide

genannt) codiert, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Aufgrund dieser unkonventionellen Lokalisation müssen die Killerplasmide ein eigenes Replikations- und Genexpressionssystem etablieren. Die Gene dafür trägt pGKL2, während die Toxin-Gene auf dem separaten Plasmid pGKL1 zu finden sind (Abb. 1).

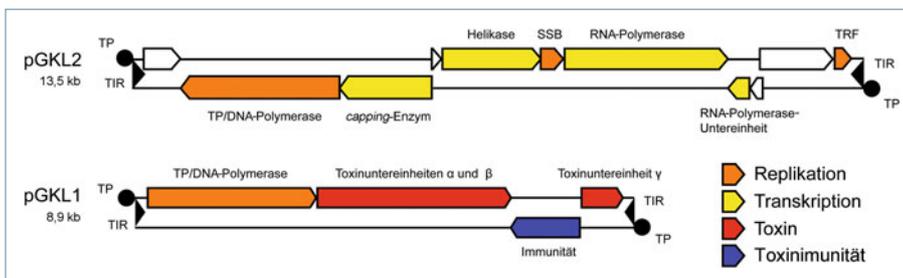
Genetische Struktur der Killerplasmide verweist auf virale Verwandtschaft

Die von pGKL2 codierten Replikations- und Transkriptionsfaktoren (Abb. 1) zeigen auffallende Ähnlichkeiten zu viralen Proteinen. pGKL2 codiert beispielsweise ein mRNA-capping-Enzym, das nahe verwandt mit entspre-

chenden Proteinen aus der Gruppe der *nucleocytoplasmic large DNA viruses* ist. Die Replikation verläuft unter Verwendung einer DNA-Polymerase, die zum viralen B-Typ gehört und über eine Domäne verfügt, die später kovalent am 5'-Ende der DNA als terminales Protein verbleibt. Als Primer dient der Replikation eine freie Hydroxylgruppe eines Aminosäurerestes (Serin, Threonin oder Tyrosin) des terminalen Proteins, an dem das Initiatorkernucleotid gebunden wird. Diese *protein-primed*-Methode der Replikation nutzen auch bestimmte Bakteriophagen sowie Adenoviren. Aufgrund dieser und weiterer Ähnlichkeiten zu viralen Proteinen werden die linearen Plasmide pGKL1/2 auch als *virus-like elements* (VLE) bezeichnet. Außer in *K. lactis* wurden pGKL2-ähnliche VLEs auch in anderen Hefen, wie z. B. in *Pichia acaciae* mit nahezu identischer Genomorganisation gefunden [1].

Das Killertoxin nutzt die Strategie des Trojanischen Pferdes

Zymocin, ein sekretiertes Heterotrimer ($\alpha\beta\gamma$), wird von pGKL1 codiert, das aufgrund der Abhängigkeit von einem zytoplasmatischen Replikations- und Genexpressionssystem nur zusammen mit pGKL2 in der Zelle existieren kann (Abb. 1). Zur Wirkungsentfaltung vermittelt der Zymocinkomplex die Einschleusung seiner toxischen α -Untereinheit, ähnlich der Strategie des Trojanischen Pferdes (Abb. 2). Dabei bindet der trimere ($\alpha\beta\gamma$) Komplex über seine α -Untereinheit an das Zellwandpolymer Chitin und importiert die γ -Untereinheit in das Zellinnere, wo sie tRNAs selektiv in der Anticodonschleife schneidet (Abb. 2, [2, 3]). Eine analoge Strategie nutzt auch das Ribotoxin PaT der Hefe *P. acaciae*, dessen toxische Komponente sich aber von der des Zymocins auf Ebene der Sequenz und der tRNA-Spezifität unterscheidet. So zeigt die Zymocin-Untereinheit (γ) eine höhere Affinität zur tRNA^{Glu}UUC, während die PaT-Untereinheit präferenziell tRNA^{Glu}UUG schneidet. Weitere Unterschiede betreffen die Abhängigkeit von der Modifikation 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin



▲ **Abb. 1:** Das pGKL1/2-System. Genomorganisation der Plasmide pGKL1 und pGKL2 mit der Funktion einzelner Gene. pGKL1 codiert das heterotrimere Toxin Zymocin ($\alpha\beta\gamma$), welches die Zielzelle durch die tRNase-Aktivität der γ -Untereinheit inhibiert. Zymocin kann nur in Abhängigkeit vom Replikations- und Genexpressionssystem des pGKL2-Plasmids existieren. SSB: Einzelstrangbindende Proteine; TP: terminales Protein; TIR: *terminal inverted repeat*; TRF: *terminal recognition factor*.

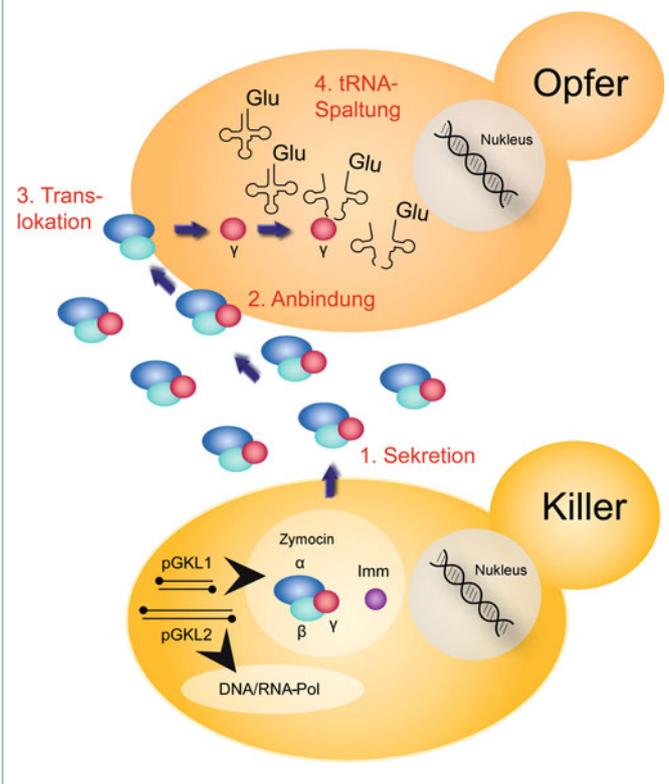
(mcm⁵s²U) der Ziel-tRNA an der Spaltstelle (**Abb. 3**), dem *wobble*-Uridin. Während diese essenziell für das Zymocin ist, bleibt PaT in deren Abwesenheit toxisch [1]. Ein verwandtes Killerplasmidsystem aus *P. inositovora* nutzt einen ähnlichen Trojaner, um eine toxische Untereinheit mit veränderter RNA-Spezifität in die Zelle zu schmuggeln. Hier attackiert das Toxin die rRNA der Zielzelle [4]. Da die transportierten toxischen Untereinheiten sowohl auf Sequenzebene als auch im Wirkmodus variabel sind, scheint es sich bei diesem Typ von Toxinen um eine Art universellen *shuttle* zu handeln.

Das Immunitätsgen kann nur im Zytoplasma exprimiert werden

Alle bisher charakterisierten tRNase-Toxine aus Hefen haben gemein, dass Tochterzellen, die nach der Zellteilung kein Plasmidsystem etablieren, eliminiert werden. Grundsätzlich sind also die Träger der Killerplasmide sensitiv gegenüber dem Toxin, werden aber durch die Anwesenheit eines Immunitätsgens auf dem Killerplasmid vor dem eigenen Toxin geschützt. Somit scheint der Zweck des Toxins die Stabilisierung der zytoplasmatischen DNA zu sein, die ansonsten leicht spontan eliminiert werden kann [1]. Seit Längerem ist bekannt, dass zwischen Kern und Zytoplasma ein reger DNA-Austausch erfolgt. Es konnten in verschiedenen Hefegenomen Fragmente identifiziert werden, die direkt von zytoplasmatischen VLEs abstammen. Diese Möglichkeit der Rekrutierung von Killerplasmid-Genen im Zellkern stellt eine Gefährdung der Plasmid-Stabilisierung durch das Toxin dar: Etabliert sich das Immunitätsgen im Kern und wird dort funktionell exprimiert, könnten Tochterzellen nach spontanem Verlust des Plasmidsystems nicht mehr eliminiert werden. Neue Arbeiten zeigen jedoch, dass die Killerplasmide einen Mechanismus entwickelt haben, der die Rekrutierung des Immunitätsgens im Zellkern verhindert [5]. Die Killerplasmide zeigen einen deutlich höheren Adenin/Thymin(A/T)-Gehalt als nukleäre Gene, und diese Eigenschaft führt zu einer Verwirrung des Polyadenylierungssystems. Normalerweise werden Transkripte im Kern nach einer A/T-reichen Sequenz (z. B. AATAAA) stromabwärts des Stoppcodons gespalten und polyadenyliert. Aufgrund des hohen A/T-Gehalts der Immunitätstranskripte werden diese bei nukleärer Transkription innerhalb des offenen Leserasters gespalten und polyadenyliert. Bei Bildung der Immunitätstranskripte im Zytoplasma findet diese Prozessierung aufgrund der nukleären Lokalisation des Polyadenylierungssystems hingegen nicht statt. Somit bedingt der hohe A/T-Gehalt eine Behinderung der Genexpression im Falle einer Rekrutierung einzelner Gene durch den Zellkern [5].

Killertoxine als Tools

Die Abhängigkeit des Zymocins von der *wobble*-Uridin-Modifikation mcm⁵s²U kann als diagnostisches Tool zur Identifikation von Genen genutzt werden, die eine Rolle bei der Synthese dieser Modifikation spielen (**Abb. 3**). So wurde über den Phänotyp Zymocin-Resistenz die Rolle des multimeren Elongatorkomplexes in der tRNA-Modifikation identifiziert. Dem Elongatorkomplex wurde zunächst eine zentrale Funktion in der Transkription zugeschrieben. Nach Charakterisierung der mcm⁵s²U-abhängigen tRNase-Funktion von Zymocin konnte die Resistenz von Mutanten mit Defekten in Elongator-Untereinheiten jedoch mit einer direkten Rolle des Elongatorkomplexes in der tRNA-Modifikation

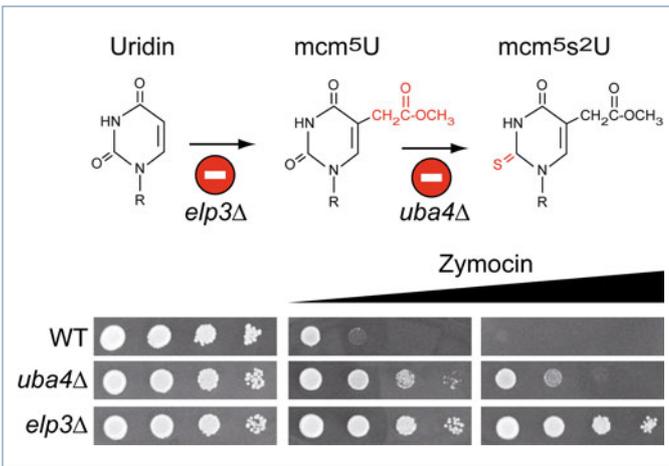


◀ **Abb. 2:** Expression und Wirkung von Zymocin. Die Plasmide pGKL1 und pGKL2 innerhalb der Killerzelle codieren ein zytoplasmatisches Replikations- und Genexpressionssystem (DNA/RNA-Pol) sowie das Zymocin und einen Immunitätsfaktor (Imm). Zymocin wird sekretiert (1) und schleust nach Anbindung an die Zielzelle (Opfer; 2) eine toxische Untereinheit (γ) in die Zielzelle ein (3), wo es hauptsächlich zur Spaltung von tRNA^{Glu} kommt (4).

in Verbindung gebracht werden (**Abb. 3**). Verschiedene genomweite Screenings auf Zymocin-Resistenz führten zur Identifikation weiterer Gene, die eine Rolle in der Regulation des Elongators spielen [1, 2]. Weiterhin konnten so Komponenten des separaten Thiolierungsweges identifiziert werden, der zur Übertragung des Schwefels auf die tRNA (s²) im Rahmen der mcm⁵s²U-Modifikation notwendig ist (**Abb. 3**). Die Einführung dieser Thiogruppe erfolgt auch in Abwesenheit eines

funktionellen Elongatorkomplexes, und ein Thiolierungsdefekt verhindert nicht die Addition der mcm⁵-Seitengruppe [6]. Für die tRNA-Erkennung durch Zymocin sind die s²- und mcm⁵-Reste jedoch von unterschiedlicher Relevanz (**Abb. 3**). So führt eine Blockierung der Thiolierung zu einer verminderten Zymocin-Sensitivität, eine Inhibition der mcm⁵-Seitengruppe jedoch zu vollständiger Resistenz (**Abb. 3**). Aufgrund der Komplexität der Regulation [7, 8] ist das Zymocin auch in der laufenden

Forschung ein essentielles Tool zur schnellen Diagnose von mcm⁵s²U-Defekten an der wobble-Position. ■



▲ **Abb. 3:** Schrittweise Modifikation des wobble-Uridins zum 5-Methoxycarbonylmethyl-2-thiouridin (mcm⁵s²U). Oben: Mutationen in Genen für Elongator-Untereinheiten (z. B. *elp3*) oder des Schwefeltransfersystems (z. B. *uba4*) blockieren entweder die Seitengruppenaddition am C5 oder die Thiolierung am C2. Unten: Beide Modifikationen sind unterschiedlich relevant für die Funktion des Zymocins. Dargestellt sind serielle Zellverdünnungen des Wildtyps bzw. einer *elp3*- oder *uba4*-Mutante, die auf Zymocin-freies Medium (links) oder Zymocin-haltiges Medium (relativer Konzentrierungsfaktor ~ 0,1 und ~ 1) aufgetropft wurden.

nase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans* 35:1533–1537
 [3] Nandakumar J, Schwer B, Schaffrath R et al. (2008) RNA repair therapy: an antidote to cytotoxic eukaryal RNA damage. *Mol Cell* 31:278–286
 [4] Kast A, Klassen R, Meinhardt F (2014) rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin. *Mol Microbiol* 91:606–617
 [5] Kast A, Voges R, Schroth M et al. (2015) Autoselection of cytoplasmic yeast virus like elements encoding toxin/antitoxin systems involves a nuclear barrier for immunity gene expression. *PLoS Genet* 11:e1005005
 [6] Klassen R, Grunewald P, Thüring KL et al. (2015) Loss of anticodon wobble uridine modifications affects tRNA^{lys} function and protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 10:e0119261
 [7] Abdel-Fattah W, Jablonowski D, Di Santo R et al. (2015) Phosphorylation of Efp1 by Hrr25 is required for elongator-dependent tRNA modification in yeast. *PLoS Genet* 11:e1004931
 [8] Scheidt V, Jüdes A, Bär C et al. (2014) Loss of wobble uridine modification in tRNA anticodons interferes with TOR pathway signaling. *Microb Cell* 1:416–424

Korrespondenzadresse:

Dr. Roland Klassen
 Prof. Dr. Raffael Schaffrath
 Institut für Biologie
 Fachgebiet Mikrobiologie
 Universität Kassel
 Heinrich-Plett-Straße 40
 D-34132 Kassel
 Tel.: 0561-804-4175 (R. Schaffrath),
 -4340 (R. Klassen)
 schaffrath@uni-kassel.de
 roland.klassen@uni-kassel.de

AUTOREN



Raffael Schaffrath (li.) und Roland Klassen

Roland Klassen

Jahrgang 1974. Biologiestudium an der Universität Münster; dort 2004 Promotion im Fach Mikrobiologie. 2005–2009 Postdoc in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Meinhardt. 2009–2012 Postdoc und *Staff Scientist* an der University of Texas Medical Branch, Galveston, USA. Seit 2013 wissenschaftlicher Mitarbeiter und Habilitant im Fachgebiet Mikrobiologie an der Universität Kassel.

Raffael Schaffrath

Jahrgang 1963. Biologiestudium an den Universitäten Bonn, Münster, Shillong (Indien) und Dundee (UK). 1995 Promotion am Leicester Biocenter, UK. 1996–1997 *Feodor-Lynen Fellow* der Alexander von Humboldt-Stiftung, Harvard Medical School Boston, MA, USA. 1997–2007 Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, Universität Halle/Saale. 2003 Habilitation im Fach Genetik. 2007–2010 *Reader in Genetics*, University of Leicester, UK. Seit 2011 Professor für Molekulare Mikrobiologie, Universität Kassel.

Danksagung

Die Autoren danken der DFG (KL2937/1-1; SCHA750/2; SCHA750/15; SCHA750/18; SCHA750/20) für finanzielle Unterstützung.

Literatur

[1] Satwika D, Klassen R, Meinhardt F (2012) Anticodon nuclease encoding virus like elements in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:345–356
 [2] Jablonowski D, Schaffrath R (2007) Zymocin, a composite chiti-