

IMMUNBIOLOGIE

Immunabwehr fremder Nukleinsäuren – Thema mit Variationen

Ob DNA oder RNA, das Erbgut von Viren und Mikroorganismen zeigt Infektionen an. Die zellfremden Nukleinsäuren werden von den cGAS (cyclic GMP-AMP-synthase) ähnlichen Mustererkennungsrezeptoren aufgespürt, die dabei enzymatisch aktiv werden und zyklische Nukleotide als sekundäre Botenstoffe bilden. Diese wiederum initiieren Signalketten, die das Alarmsignal in den Zellkern weiterleiten und die angeborene Immunabwehr anschalten. Das Erbe von Bakterien, die mit entsprechenden Komponenten Phagen abwehren, haben Metazoa von Hydra bis zum Menschen für ihre angeborene Immunabwehr adaptiert.

Unter dem Stichwort zyklische Nukleotide rangieren an erster Stelle bislang die Mononukleotide cAMP (2,3-zyklisches Adenosinmonophosphat) und cGMP (2,3-zyklisches Guanosinmonophosphat). Bekanntlich wirken diese als sekundäre Botenstoffe, die – ausgelöst durch externe Signale bzw. deren Bindung an Rezeptoren der Plasmamembran – intrazelluläre Signalketten anstoßen. Letztlich wird so beispielsweise der Stoffwechsel an wechselnde Bedingungen angepasst oder beim Sehvorgang ein Nervenimpuls ausgelöst. Ihrer Struktur nach handelt es sich um *intramolekulare* zyklische Diester, bei denen Phosphorsäure zwei benachbarte Hydroxygruppen eines Ribosemoleküls verbindet. Bei einer bislang wenig beachteten Gruppe von Botenstoffen, den zyklischen Dinukleotiden, verbinden dagegen *intermolekulare* Phosphodiesterbrücken zwei Ribosemoleküle zu einem Ring mit unterschiedlichen Kombinationen von Purin- und Pyrimidin-Basen (Abbildung 1). Lange Zeit galten die zyklischen Dinukleotide als Besonderheit von Bakterien, bei denen sie als Botenstoffe komplexe Vorgänge wie den Übergang von einer schwimmenden zur sessilen Lebensweise (3'3'-c-di-GMP), Chemotaxis oder Virulenz (3'3'-cGAMP) regulieren [1].

Dass zyklische Dinukleotide auch bei Eukaryonten relevant sind, zeigte sich erstmals 2013 anhand des cGAS-STING-Signalwegs der Säugetiere, eines Mechanismus zur Abwehr fremder, in Zellen eingedrungener

Nukleinsäuren. Als Sensor fungiert dabei das Enzym cGAS (*cyclic GMP-AMP-synthase*), das nur aktiv ist, wenn es doppelsträngige DNA als Effektor gebunden hat. Im Cytosol angesiedelt kommt die cGAS mit der im Zellkern verpackten DNA nicht in Kontakt, sondern spürt zellfremde DNA auf, beispielsweise nach Infektionen mit Viren oder Mikroorganismen. Aktiviert durch DNA als Alarmsignal bildet die cGAS das zyklische 2'3'-GMP-AMP, kurz 2'3'-cGAMP. Letzteres bindet an das STING-Protein (*stimulator of interferon genes*) und initiiert so eine von Interferon- β und NF- κ B vermittelte, die angeborene Immunabwehr aktivierende Signalkette [2]. Zu bemerken bleibt, dass diese Signalkette – im Gegensatz zu den für die zyklischen Mononukle-

otide genannten – zwar von einem zellfremden, aber dessen ungeachtet intrazellulären Signal ausgelöst wird.

Einen regelrechten Boom in der Erforschung zyklischer Dinukleotide und ihrer Funktion ermöglichten zuletzt Hochdurchsatzmethoden der Genom-Sequenzierung, die bei Bakterien sowohl cGAS-ähnliche Enzyme als auch Homologe von STING zutage förderten [1]. Beide beteiligen sich auch bei Bakterien an Abwehrreaktionen, die in diesem Fall durch die Nukleinsäuren von Bakteriophagen ausgelöst werden [3]. Dieser Abwehrmechanismus wurde offenbar im Verlauf der Evolution konserviert: Die bislang nur von Bakterien bekannten zyklischen Dinukleotide 3'3'-c-di-GMP, 3'3'-c-di-AMP und 3'3'-cGAMP aktivieren den cGAS-STING-Signalweg auch bei Zellen der Maus [1].

Neue cGAS-ähnliche Proteine in Metazoa

Bei Insekten – dem Käfer *Tribolium castaneum* und 42 Dipteren-Arten einschließlich *Drosophila melanogaster* – wurden bereits vor zwei Jahren der cGAS des Menschen ähnliche Enzyme charakterisiert, die ebenfalls zyklische Nukleotide synthetisieren, obwohl ihre Aminosäuresequenzen insgesamt nur begrenzte Ähnlichkeit (25% Identität zur cGAS des Menschen) aufweisen [4,5].

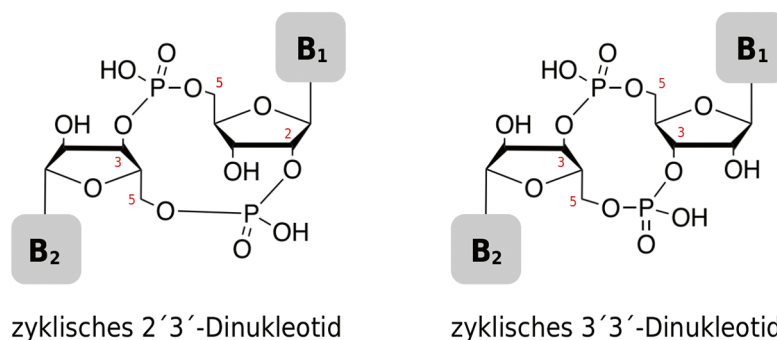


ABB. 1 Grundstruktur der zyklischen Dinukleotide mit 2'-5'/3'-5'-Verknüpfung (zyklische 2'3'-Dinukleotide) und 3'-5'/3'-5'-Verknüpfung (zyklische 3'3'-Dinukleotide). Die roten Ziffern benennen die an den Diesterbindungen beteiligten Kohlenstoffatome (zur Orientierung: das mit der Base (B) verknüpfte Kohlenstoffatom am reduzierenden Ende ist C1). Bei der Nomenklatur gemischter zyklischer Dinukleotide steht Base 1 an erster Stelle, z. B. B1 = G, B2 = A beim 2'3'-cGAMP.

Aufbauend auf diesen Befund durchforstete kürzlich ein multinationales Autorenteam unter der Leitung von Philip Kranzusch mit der BLAST-Methode alle sequenzierten Genome von Metazoa nach cGAS-ähnlichen Sequenzen [6]. Als Suchkriterien dienten unter anderem ein für die Nukleotidsynthese erforderliches saures Proteinmotiv der cGAS sowie deren Proteinstruktur determinierende Motive. So gelang die Identifizierung von insgesamt mehr als 3000 Kandidaten mit einem der cGAS ähnlichen katalytischen Zentrum in fast allen Phyla der Metazoen. Lediglich Fadenwürmer (Nematoden) und die meisten Plattwürmer (Plathelminthes) besitzen zwar entfernt ähnliche Proteine, denen aber vermutlich die enzymatische Aktivität als Nukleotidsynthase fehlt. Einzelne Genome der fast 600 untersuchten Spezies enthalten meistens ein bis fünf Kandidatengene. Besonders viele Kandidaten – über zweihundert pro Genom – fanden sich bei zwei Mollusken: der Zebrauschel (*Dreissena polymorpha*) und der Auster *Crassostrea virginica* [6]. Fliegen der Gattung *Drosophila* liegen mit drei bis sieben Kandidaten im Mittelfeld [4], während beim Menschen nach dem bisherigen Kenntnisstand nur die eingangs genannte cGAS enzymatisch aktiv ist [6].

Dass die Ähnlichkeit nicht nur die Aminosäuresequenz betrifft, sondern auch die Proteinstruktur, zeigte die Kristallisation ausgewählter cGAS-ähnlicher Proteine. Je ein Kandidat der Koralle *Stylophora pistillata* [6], der Auster *C. virginica* [6] und des Käfers *T. castaneum* [4] teilen mit der cGAS des Menschen wichtige Strukturmerkmale: Das katalytische Zentrum ist in einer tiefen, Nukleotide bindenden Tasche angesiedelt, und in einer Grube auf der gegenüber liegenden Seite fördern zahlreiche positive Ladungen die Bindung der doppelsträngigen Nucleinsäuren als Effektoren.

Funktionen cGAS-ähnlicher Proteine

Die bemerkenswert konservierte Struktur der cGAS-ähnlichen Proteine von im Stammbaum der Metazoa weit entfernten Spezies wirft die Frage nach ihrer physiologischen Funktion auf. Bei Insekten wurde enzymatische Aktivität cGAS-ähnlicher Proteine bereits vor zwei Jahren mit Hilfe isotope markierter Nucleosidtriphosphate nachgewiesen. Auch diese werden – wie die cGAS der Säugetiere – durch Bindung von Nucleinsäuren aktiviert, allerdings nicht durch DNA, sondern durch doppelsträngige Ribonucleinsäuren (dsRNA) [4]. Überraschend war, dass Fliegen der Gattung *Drosophila* neben 2'3'-cGAMP weitere zyklische Dinucleotide bilden – darunter bislang nicht bekannte wie das 3'2'-cGAMP, bei dem die Position der Nucleobasen Adenin und Guanin im Vergleich zum 2'3'-cGAMP vertauscht ist [4, 5], sowie 2'3'-c-di-GMP, das sich vom 3'3'-c-di-GMP der Bakterien durch die Position einer Diesterbrücke unterscheidet [7]. Jetzt wurden auch bei anderen Wirbellosen weitere Dinucleotide gefunden: Zyklisches di-AMP (3'3'-c-di-AMP) bei der Koralle *Stylophora pistillata* sowie gemischte Dinucleotide mit Adenin und der Pyrimidinbase Uracil (3'3'-cUAMP bei der Koralle und 2'3'-cUAMP bei Austern) [6]. Demnach sind die von Metazoen gebildeten zyklischen Dinucleotide ähnlich vielfältig wie die von Bakterien. Allerdings ist nach dem bisherigen Kenntnisstand 2'3'-cGAMP am weitesten verbreitet: Es fand sich bei Nesseltieren, Insekten und dem Menschen als Vertreter der Wirbeltiere, während die vier übrigen Dinucleotide bislang jeweils nur in einer systematischen Gruppe nachgewiesen sind. Die Entwicklung vielfältiger zyklischer Dinucleotide wird als Anpassung an Mechanismen der Immunevasion von Viren diskutiert, die durch spezielle Nucleasen, beispielsweise die Poxine, spezifisch das 2'3'-cGAMP hydrolysieren können.

Ein Teil der neu entdeckten cGAS-ähnlichen Proteine ließ sich im Reagenzglasversuch durch Nucleinsäuren aktivieren [6]. Bei zwei Austern-Spezies gelang dies wie bei Säugetieren durch DNA, während die Mehrzahl der Synthesen von Nesseltieren und Insekten durch doppelsträngige RNA aktiviert werden. Beide Gruppen kommen demnach als Nucleinsäure-Sensoren infrage. Rätselhaft bleibt die Funktion einer Reihe von Synthesen, die in gereinigter Form auch ohne Zusatz von Nucleinsäuren aktiv waren. Bislang können die Autoren der Studie nur spekulieren, ob diese Autoaktivität auf am gereinigten Enzym verbliebene endogene Nucleinsäuren der Produzentenzelle zurückzuführen ist oder ob sie auf von der cGAS abweichende Funktionen hinweist. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass für einzelne cGAS-ähnliche Proteine anhand der Aminosäurezusammensetzung große Unterschiede bezüglich des isoelektrischen Punkts (pI) vorhergesagt werden: Etwa zwei Drittel davon sind basische Proteine (pI > 8,5), so dass die Bindung von Nucleinsäuren als aktivierende Liganden plausibel erscheint. Passend dazu ließen sich nur basische Kandidaten durch Nucleinsäuren aktivieren, aber nicht solche mit einem isoelektrischen Punkt unter 7,0. Ein Teil der sauren Proteine war autoaktiv, andere zeigten unter den experimentellen Bedingungen keine enzymatische Aktivität. Ob sich letztere durch bislang unbekannte, möglicherweise positiv geladene Liganden aktivieren lassen, bleibt unklar [6].

Auch STING, das nächste Glied der durch fremde Nucleinsäuren initiierten Signalkette, ist gemäß der Genomanalyse bei Metazoen weit verbreitet [6]. In den allermeisten Fällen (88 %) fand sich pro Spezies ein Gen mit Ähnlichkeit zu dem des STING von Säugetieren, bisweilen auch mehrere (bis zu 10) Kandidaten wie bei Austern und Korallen. Strukturvorhersagen auf Basis der Aminosäuresequenz deuten auf eine

dem humanen STING ähnliche Architektur: Die aminotermine Transmembrandomäne verankert das Protein am Endoplasmatischen Retikulum und die carboxyterminale Domäne bindet das zyklische Dinukleotid.

Bei der Koralle *Stylophora pistillata* wurden die Komponenten der cGAS-STING-Signalkette exemplarisch untersucht [6]. *S. pistillata* besitzt mit 42 besonders viele cGAS-ähnliche Gene und bei drei der kodierten Proteine gelang der Nachweis enzymatischer Aktivität: Sp-cGGLR-1 und -3 wurden durch dsRNA aktiviert und synthetisierten sowohl 3'3'-cUAMP als auch 3'3'-c-di-AMP. Sp-cGGLR-2 war autoaktiv und bildete 2'3'-cGAMP. Von den sieben STING-ähnlichen Proteinen, die untereinander eine relativ hohe Sequenzidentität aufwiesen (54–75 %), gelang bei fünf die Charakterisierung der Bindungsspezifität: Sp-STING5 war dem STING des Menschen insofern am ähnlichsten, als es 2'3'-cGAMP wesentlich stärker band als alle übrigen zyklischen Dinukleotide. Sp-STING7 dagegen band alle getesteten Nukleotide gleichermaßen. Sp-STING1, -2 und -3 nahmen eine Mittelstellung ein, wobei die beiden ersteren bevorzugt 2'3'-cGAMP banden, Sp-STING3 dagegen bevorzugt 3'3'-Nukleotide. Anhand der Kristallstruktur von Sp-STING1 und 3, jeweils im Komplex mit Ligand, bestätigte sich die funktionelle Ähnlichkeit zum STING des Menschen: Alle drei Proteine bilden ein V-förmiges Homodimer mit einer zentralen Ligandbindungsstelle, in der zwei konservierte aromatische Aminosäuren mit den Basen der zyklischen Dinukleotide interagieren und ein Arginin mit den Phosphatgruppen [6].

Somit erfüllen die durch Genomanalyse ermittelten Proteinfamilien alle Kriterien einer cGAS-STING-Signalkette, deren Funktion der von Säugetieren entspricht (Abbildung 2). Die Beteiligung an der Abwehr von Viren gilt bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* als

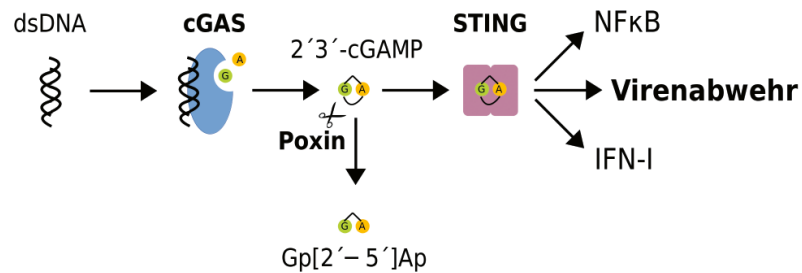


ABB. 2 Vereinfachtes Schema des cGAS-STING-Signalwegs. Die DNA infektiöser Mikroorganismen aktiviert die Nucleotidsynthase cGAS, die 2'3'-cGAMP bildet. Das zyklische Dinukleotid bindet und aktiviert das STING-Protein, das seinerseits die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermittelt und so die angeborene Immunabwehr aktiviert. Das im Cytosol eukaryontischer Zellen sehr stabile 2'3'-cGAMP kann durch virale Nucleasen, die Poxine, inaktiviert werden, die spezifisch die 3'-5'-Bindung spalten.

bestätigt [4, 5, 7]. Dazu passend [6] zeigte die Koralle *S. pistillata* nach Behandlung mit 2'3'-cGAMP und 3'3'-cUAMP (18 h) Veränderungen der Genexpression, wie sie für die Aktivierung der Immunabwehr typisch sind: Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF-3 und IRF-9 wurden verstärkt gebildet, ebenso Mustererkennungsrezeptoren sowie Signalproteine, beispielsweise der Tumornekrosefaktor TNF. Die Auster *C. virginica* reagierte auf die Injektion von 2'3'-cUAMP ebenfalls mit einem für die aktive Immunabwehr typischen Expressionsmuster, das dem nach Infektion mit Austern-Herpesvirus ähnelt. Dabei bleibt die Frage offen, wie die applizierten zyklischen Nucleotide in die Zelle gelangen, um gebunden an STING ihre Wirkung zu entfalten.

Weit verbreiteter Abwehrmechanismus

Zusammengenommen weisen die aktuellen Studien darauf hin, dass Signalketten mit cGAS-ähnlichen Enzymen, verschiedenen zyklischen Dinukleotiden und STING-Proteinen Teil eines bei Metazoen verbreiteten Abwehrmechanismus darstellen, den für die Zelle fremde Nucleinsäuren von Viren oder Mikroorganismen auslösen. Demnach gehören die cGAS-ähnlichen Nucleotidsynthasen zu den Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors, PAMP*), die unterschied-

lichste Komponenten von Viren und Mikroorganismen aufspüren und dafür sorgen, dass die angeborene Immunabwehr aktiviert wird. Entsprechend ihrer mutmaßlichen Funktion erhielt die neue Proteinfamilie den Namen *cGAS-like receptors* (cGLRs) in Anlehnung an die Gruppe der Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*Toll-like receptors, TLR*), die sich ebenfalls an der Regulation von Immunreaktionen beteiligen [4]. Im Detail ist bemerkenswert, dass cGLRs offenbar auch bei *Drosophila* Bestandteil der Immunabwehr sind, während die Toll-ähnlichen Rezeptoren bei dieser Fliege entwicklungsbiologisch relevant sind. Die bislang geltende Auffassung, dass die Abwehr von *Drosophila* allein auf RNA-Silencing zurückgeht, muss damit als obsolet gelten.

Literatur

- [1] A. T. Whiteley et al. (2019). *Nature* 567, 194–199.
- [2] P. J. Kranzusch (2019). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 59, 178–187.
- [3] B. R. Morehouse et al. (2020). *Nature* 586, 429–433.
- [4] K. M. Slavik et al. (2021). *Nature* 597, 109–113.
- [5] A. Holleufer et al. (2021). *Nature* 597, 114–118.
- [6] Y. Li et al. (2023). *Cell* 186, 3261–3276. e20.
- [7] H. Cai et al. (2023). *Immunity* 28, S1074–7613(23)00362-X.

Annette Hille-Rehfeld