

TWINCORE - Institut für Molekulare Bakteriologie

■ Leiter: Prof. Dr. Susanne Häußler

Tel.: 0511-220027212 und 0531-6181-3000 • E-Mail: Haeussler.Susanne@mh-hannover.de • www.twincore.de/forschung/arbeitsgruppen/molekulare-bakteriologie/

- Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilms; regulation; susceptility; resistome; virulence factors; c-di-GMP; anti-biofilm; antibiotic resistance

Forschungsprofil

Im Mittelpunkt unseres wissenschaftlichen Interesses stehen die molekularen Mechanismen, die der Etablierung von chronisch persistierenden *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen zugrunde liegen. *P. aeruginosa* ist ein opportunistischer Erreger, der schwere akute und chronische Infektionen hervorrufen kann. Eine chronische *P. aeruginosa* Infektion von erheblicher klinischer Bedeutung ist die Infektion der Lunge von Mukoviszidose Patienten. *P. aeruginosa* überlebt dort in sogenannten Biofilmen und widersteht, eingekapselt in eine selbst-produzierte extrazelluläre Matrix, dem Immunsystem und auch intensiverer antibiotischer Therapie.

Wir fokussieren unsere Arbeiten auf die Untersuchung von bakteriellen Faktoren, die strukturellen und regulatorischen Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen und widmen uns der Bedeutung von inter- und intra-bakterieller Signaltransduktion bei der Pathogenese chronischer Infektionen. Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Identifizierung von adaptiven Mutationen.

Diese entstehen im Rahmen der Anpassung an den Wirt und führen zur Generierung von genetischer Diversität und Selektion von Antibiotika-resistenten Bakterien und von besonders gut adaptierten *P. aeruginosa* Phänotypen. Erkenntnisse aus unseren Studien sollen als Grundlage für die Entwicklung von alternativen Therapie-Strategien dienen, die auch gegenüber Antibiotika-resistenten und chronischen Biofilm-Infektionen wirksam sind.

Ausgewähltes Forschungsprojekt

Proteomanalysen zur Erforschung posttranskriptioneller Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*

Das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein nosokomialer Erreger, der sich schnell an verschiedenste Umweltbedingungen anpassen kann. Hoch-akute aber auch chronische Verlaufsformen, bei denen *P. aeruginosa* einen schützenden Biofilm ausbildet, sind schwer mit dem vorhandenen Spektrum an antimikrobiellen Wirkstoffen zu bekämpfen. Die hohe Anpassungsfähigkeit verdankt der Erreger einem sehr komplexen, regulatorischen Netzwerk. Während die Mechanismen der transkriptionellen Regulation gut untersucht sind, erscheint die Bedeutung der post-transkriptionellen Regulation auch aufgrund der technisch schwierigeren Untersuchungsmethoden unterschätzt. Um in Zukunft neue, wirkungsvollere Mittel zur Bekämpfung klinischer relevanter *P. aeruginosa* Infektionen entwickeln zu können, ist eine detaillierte Kenntnis zellulärer Mechanismen zur Anpassung an wechselnde Habitats und Bedingungen unerlässlich.

Bisher wenig erforscht sind Faktoren, die eine posttranskriptionell-regulatorische Rolle spielen. Die Methyltransferase P_{rmC} unterstützt durch Methylierung von Translations-Terminations-Faktoren die Termination der Translation und beeinflusst damit die Fertigstellung von neusynthetisierten Proteinen. Ohne die Methylierung der Terminationsfaktoren kommt es häufig zu einem Durchlesen der mRNA am Ribosom, sodass artifiziell verlängerte Proteine entstehen. Das Enzym ist damit essentiell für die Synthese funktioneller Proteine und dient der Aufrechterhaltung der physiologischen Proteinhomöostase. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass ein Fehlen von P_{rmC} nicht nur bei *P. aeruginosa*, sondern auch bei anderen Bakterien in einer verringerten Pathogenität und Anpassungsfähigkeit resultiert. Damit stellt

dieses Enzym ein potentes Ziel für antimikrobielle Therapien dar. Unklar blieben in diesen Studien allerdings die genauen zellulären Abläufe, die von der Modulation der Enzymfunktion zum veränderten Phänotyp führen.

Zur detaillierten Untersuchung der zellulären Mechanismen, die bei Fehlen von PrmC zur verringerten Pathogenität und Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* führen, wurde in Zusammenarbeit mit der Zentralen Forschungseinrichtung Proteomics der MHH (Leitung A. Pich) eine Methode zur quantitativen Proteomanalyse für den *P. aeruginosa* Laborstamm PA14 etabliert. Zur Anwendung kam das metabolische „Stable isotope labeling by amino acids in cell culture“ (SILAC) Markierungsverfahren, das eine sehr exakte Quantifizierung von Proteinen auf globaler Ebene ermöglicht. Kombiniert wurde die SILAC Technik mit hochauflösender LC-MS/MS-Analyse. Dabei hat sich ein prototropher Stamm, der eine Mutation im Lysin Abbau besitzt für die Markierung mit stabilen Isotopen markiertem Lysin (lys8) bewährt. Die so markierten Proteine des Stammes konnten als Standard für quantitative Proteomanalysen verwendet werden. Mit diesem etablierten System wurde eine *prmC*-defiziente PA14 Mutante (*prmC*-KO) mit einem *prmC*-überexprimierenden (*prmC*-OE) Stamm auf Proteinebene verglichen (siehe Abbildung 1). Insgesamt konnten mit dem Ansatz 2722 Proteine detektiert und 1699 quantifiziert werden. Von diesen wiesen wiederum 94 eine signifikant höhere und 296 eine signifikant niedrigere Abundanz auf.

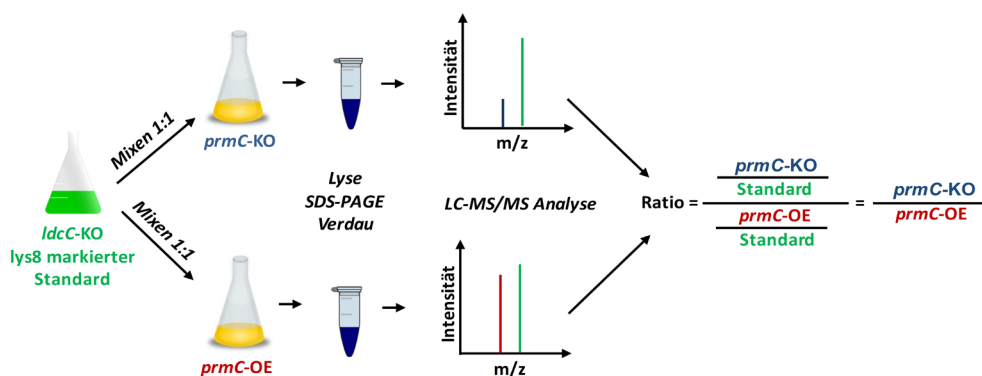


Abb. 1: Schematische Darstellung einer SILAC basierten Proteomanalyse in *P. aeruginosa*. Für die Proteomanalyse wurden die Kulturen der *prmC* defizienten (*prmC*-KO) und der *prmC* überexprimierenden (*prmC*-OE) Stämme 1:1 mit einem Lysin8 markierten Standard gemischt. Anschließend erfolgte die Zellyse, die Auftrennung mittels SDS-PAGE und der Verdau der fraktionierten Proteine mittels LysC. Die komplexen Peptidgemische wurden mittels LC-MS/MS analysiert und die Rohdaten mit der MaxQuant Software prozessiert. Die resultierenden Abundanzen in Relation zum Standard wurden durch Quotientenbildung zu *prmC*-KO vs. *prmC*-OE Relationen kombiniert.

Neben der globalen Proteomanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Genomanalytik am HZI (Leiter R. Geffers) mittels „Next generation sequencing“ (NGS) eine Transkriptomanalyse durchgeführt, die einen globalen Vergleich von Genexpression und Proteinsynthese erlaubt. Indem die Quotienten aus Protein und mRNA Menge bei *prmC* Defizienz und bei *prmC* Überexpression ermittelt wurden, konnten Gene identifiziert werden, die nur PrmC abhängige Veränderungen der Translationsrate aufwiesen (Abbildung 2). Interessanterweise zeigten die Gene mit einer verringerten, PrmC abhängigen Translationsrate einen höheren Anteil an UAG Stopp Codons. Daraus konnte geschlossen werden, dass die variable Nutzung der drei Stopp Codons im PA14 Genom in einer PrmC abhängigen, differentiellen Proteinbiosynthese resultiert. Die anschließende Analyse ihrer Häufigkeiten in funktionellen Gruppen (PseudoCAP) von PA14 Genen ergab auffällig viele Zusammenhänge zwischen Funktion eines Gens und Art des assoziierten Stopp Codons. So enden z.B. Gene der Kategorie „Chaperone & heatshock proteins“ selten mit dem UAG Codon, während Gene der Kategorie „Transcriptional regulators“ häufiger mit diesem enden und somit bei Fehlen von PrmC stärker von einer verminderten Translationseffizienz betroffen sind.

Neben dem Einfluss der prnC Expression auf das Proteinprofil wurde zusätzlich untersucht, ob das Fehlen der Methyltransferase zu einem erhöhten Durchlesen von Stopp Codons führt. Dadurch würden Sequenzen nach dem C-terminus translatiert werden und Proteine künstlich verlängert vorliegen. Durch angepasste Auswertung der MS/MS-Daten konnten jedoch nur wenige Peptide identifiziert werden, die durch ein Überlesen des Stopp Codons entstanden sind. Die geringe Abundanz dieser Peptide könnte darauf hindeuten, dass die verlängerten Proteine in ihrer Funktion eingeschränkt sind, abgebaut werden und nicht mehr detektiert werden können. Eine Degradation der artifizell verlängerten Proteine könnte wiederum die Erklärung für die niedrigere Abundanz mancher Proteine bei Fehlen von PrnC liefern.

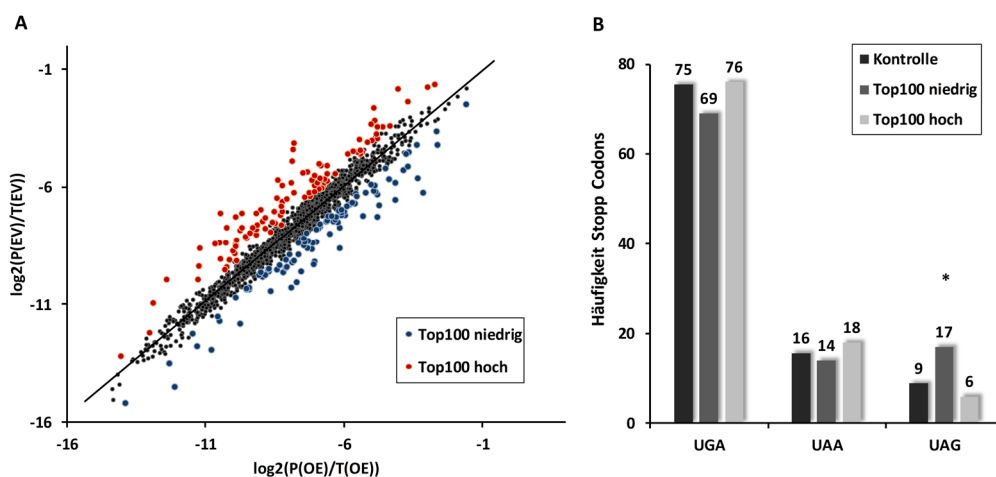


Abb. 2: Korrelationsanalyse von prnC-abhängigen Protein zu mRNA Verhältnissen. A: Die Protein zu mRNA Verhältnisse der prnC-KO und prnC-OE Stämme wurden gegeneinander aufgetragen. B: Häufigkeit der Stopp Codons UGA, UAA und UAG bei erhöhter bzw. erniedrigter PrnC abhängiger Translationseffizienz im Vergleich zu allen auf Proteinebene quantifizierten Genen.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass mithilfe der Kombination von SILAC basierten Proteomanalysen und NGS basierten Transkriptomanalysen der Zusammenhang zwischen der Enzymfunktion von PrnC und dem charakteristischen Phänotyp beim Fehlen dieses Enzyms weiter aufgeklärt werden konnte. Den Stopp Codons konnte eine wichtige Rolle in der PrnC abhängigen Translationseffizienz aller Gene zugeordnet werden. Diese PrnC Abhängigkeit führt schlussendlich zu dem veränderten zellulären Proteinprofil und liefert damit eine Erklärung für den attenuierten Phänotyp. Die Etablierung der SILAC basierten quantitativen Proteinanalysen ermöglicht zukünftige Untersuchungen, die außer globalen Proteinquantifizierungen auch die Aufnahme von Proteinkinetiken zum Ziel haben. Moderne Methoden wie das „Ribosome profiling“, bei dem aktiv translatierte mRNA Bereiche nachgewiesen werden, könnten helfen den Mechanismus von PrnC noch detaillierter aufzuklären, sodass mit einem besseren Verständnis der zellulären Vorgänge die Grundlage für die Entwicklung neuer antimikrobieller Therapiestrategien gegeben ist.

■ Projektleitung: Häubler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: Pich, Andreas (Prof.), Core Unit Proteomics und Institut für Toxikologie, MHH; Geffers, Robert (Dr.), Technologieplattform Genomanalytik, HZI externe Förderung

Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2015)

Quantitative und qualitative Genexpression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Förderung: HGF Helmholtz

Identifizierung von genetischen Antibiotika-Resistenz Determinanten in *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Förderung: ERC (RESISTOME), EU

C-di-GMP Signalling in *Pseudomonas aeruginosa*.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: Projektpartner innerhalb des SFB900; Förderung: DFG, Teilprojekt im SFB900

Globale Quantifizierung einer c-di-GMP abhängigen Genexpressionskontrolle

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: Projektpartner innerhalb des IRTG1273 (u.a. Karolinska Institute); Förderung: Teilprojekt im Graduiertenkolleg IRTG 1273, DFG

Entwicklung von Inhibitoren zur Prävention und Behandlung von Biofilmmhumanpathogenen Bakterien.

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: HZI, Sanofi, ITEM, LUH; Förderung: BMBF

Evaluierung eines optischen Testsystems zur Suszeptibilitäts-testung von Biofilm gewachsenen *Pseudomonas aeruginosa* CF-Isolaten

■ Projektleitung: Häußler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: Sauer-Heilborn, Annette (Dr.), Mukoviszidose Ambulanz, MHH; Suerbaum, Sebastian (Prof.), Institut für Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, MHH; Förderung: Mukoviszidose Institut gGmbH

WP5E, Teilprojekte 4.1 Pathogen Susceptibility and biomarkers 4.2 Development of highthroughput genotyping assays

■ Projektleitung: WP5E: Pessler, Frank (Dr.), Experimentelle Infektionsforschung, Twincore; Teilprojekte: Häußler, Susanne (Prof.); Kooperationspartner: innerhalb des Konsortiums; Förderung: EU, COMBACTE

Originalpublikationen

Bielecki P, Jensen V, Schulze W, Gödeke J, Strehmel J, Eckweiler D, Nicolai T, Bielecka A, Wille T, Gerlach RG, Häußler S. Cross talk between the response regulators PhoB and TctD allows for the integration of diverse environmental signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* 2015;43(13):6413-6425

Blanka A, Düvel J, Dötsch A, Klinkert B, Abraham WR, Kaever V, Ritter C, Narberhaus F, Häußler S. Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. *Sci Signal* 2015;8(372):ra36

Bruchmann S, Muthukumarasamy U, Pohl S, Preusse M, Bielecka A, Nicolai T, Hamann I, Hillert R, Kola A, Gastmeier P, Eckweiler D, Häußler S. Deep transcriptome profiling of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals strain and sequence type-specific adaptation. *Environ Microbiol* 2015;17(11):4690-4710

Casilag F, Lorenz A, Krueger J, Klawonn F, Weiss S, Häußler S. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect Immun* 2015;84(1):162-171

Dötsch A, Schniederjans M, Khaledi A, Hornischer K, Schulz S, Bielecka A, Eckweiler D, Pohl S, Häußler S. The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptional Landscape Is Shaped by Environmental Heterogeneity and Genetic Variation. *MBio* 2015;6(4):e00749

Düvel J, Bense S, Möller S, Bertinetti D, Schwede F, Morr M, Eckweiler D, Genieser HG, Jänsch L, Herberg FW, Frank R, Häußler S. Application of Synthetic Peptide Arrays To Uncover Cyclic Di-GMP Binding Motifs. *J Bacteriol* 2015;198(1):138-146

Lassak J, Keilhauer EC, Fürst M, Wuichet K, Gödeke J, Starosta AL, Chen JM, Søgaard-Andersen L, Rohr J, Wilson DN, Häußler S, Mann M, Jung K. Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P. *Nat Chem Biol* 2015;11(4):266-270

Oumeraci T, Jensen V, Talbot SR, Hofmann W, Kostrzewa M, Schlegelberger B, von Neuhoff N, Häußler S. Comprehensive MALDI-TOF biotyping of the non-redundant Harvard *Pseudomonas aeruginosa* PA14 transposon insertion mutant library. *PLoS One* 2015;10(2):e0117144

Pawar V, Komor U, Kasnitz N, Bielecki P, Pils MC, Gocht B, Moter

A, Rohde M, Weiss S, Häussler S. In Vivo Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(8):4974-4981

Schulz S, Eckweiler D, Bielecka A, Nicolai T, Franke R, Dötsch A, Hornischer K, Bruchmann S, Düvel J, Häussler S. Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk. *PLoS Pathog* 2015;11(3):e1004744

Abstracts

2015 wurden 10 Abstracts publiziert.

Promotionen

Brouwer, Stephan: New perspectives on post-transcriptional regulation mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*.

Master

Hartlich, Juliane (M.Sc.): Development of new algorithms for NGS data analysis.

Markovic, Marian (M.Sc.): Der Einfluss von Antibiotikaresistenzen auf die Fitness von *Pseudomonas aeruginosa*.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Häubler, Susanne (Prof.): Gutachtertätigkeiten für internationale Fachzeitschriften; Vorstandsmitglied im ZIB - Zentrum für Infektionsbiologie; Vorstand des wissenschaftlichen Kollegiums am HZI; Vorstandsmitglied im SFB900.

Patente

Häubler, Susanne (Prof.) und Müsken, Mathias (Dr.): PqsR Modulators (EP13005809) (bereits Juni 2014 erteilt; Haupterfinder Prof. Rolf Hartmann, HIPS).