

## Molekulare Infektionsbiologie

# RNA-basierte Kontrollmechanismen der *Yersinia*-Virulenz

ANNE-SOPHIE STOLLE, MARCEL VOLK, INGA BENZ, ILEANA SALTO, PETRA DERSCH  
INSTITUT FÜR INFEKTILOGIE, UNIVERSITÄT MÜNSTER

**Enteropathogenic *Yersiniae* evolved a plethora of virulence traits which allow them to colonize the intestine and gut-associated lymphatic tissues of mammals. In these host niches they have to tightly adjust the expression of required pathogenicity factors to resist attacks by the host immune system. Here, we present how enteric *Yersiniae* use intricate control networks which include numerous regulatory and sensory RNAs, RNA-binding proteins and RNases to control their virulence attributes.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1492-1  
© Die Autoren 2020

■ Darmpathogene *Yersinien* haben die Fähigkeit, sich im Darmtrakt des Menschen und von Säugetieren anzusiedeln, die Darmepithelschicht zu überqueren und in darunterliegende lymphatische Gewebe einzudringen. Dieser Prozess löst eine Reihe von darmassoziierten Entzündungserkrankungen aus, die als *Yersiniosen* bezeichnet werden. Auch immunpathologische Folgeerkrankungen, wie z. B. Gelenkentzündungen, wer-

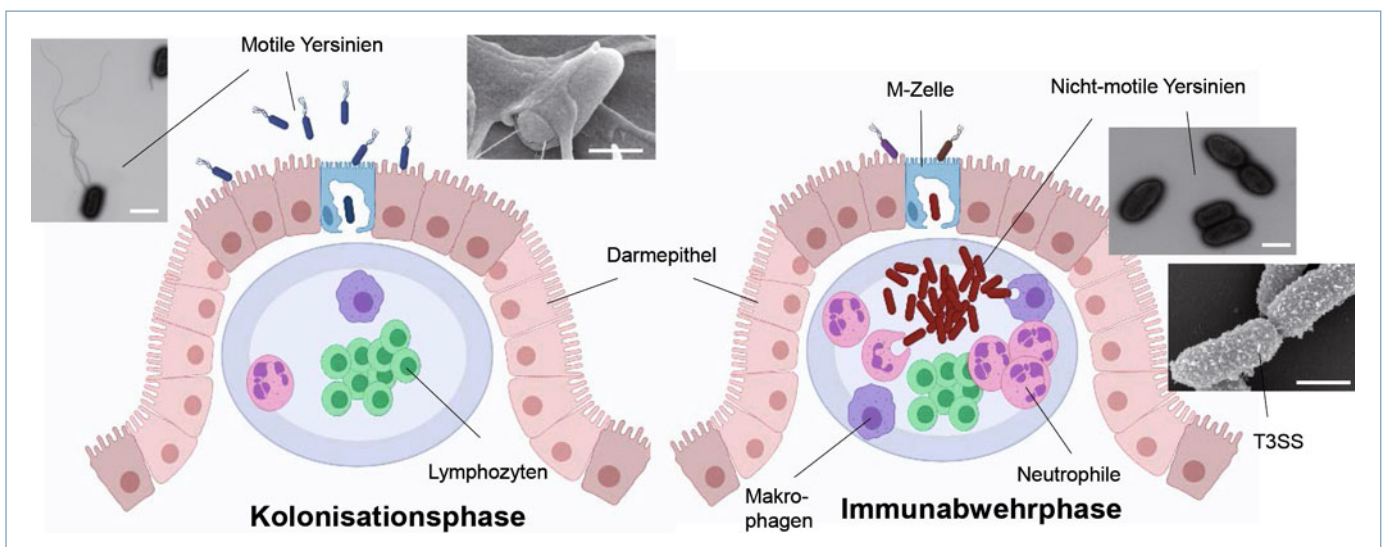
den in manchen Fällen beobachtet. Der Krankheitsverlauf kann in die initiale Kolonisationsphase und die Immunabwehrphase mit akuten Krankheitssymptomen unterteilt werden (**Abb. 1**).

### Entdeckung RNA-basierter Kontrollsysteme

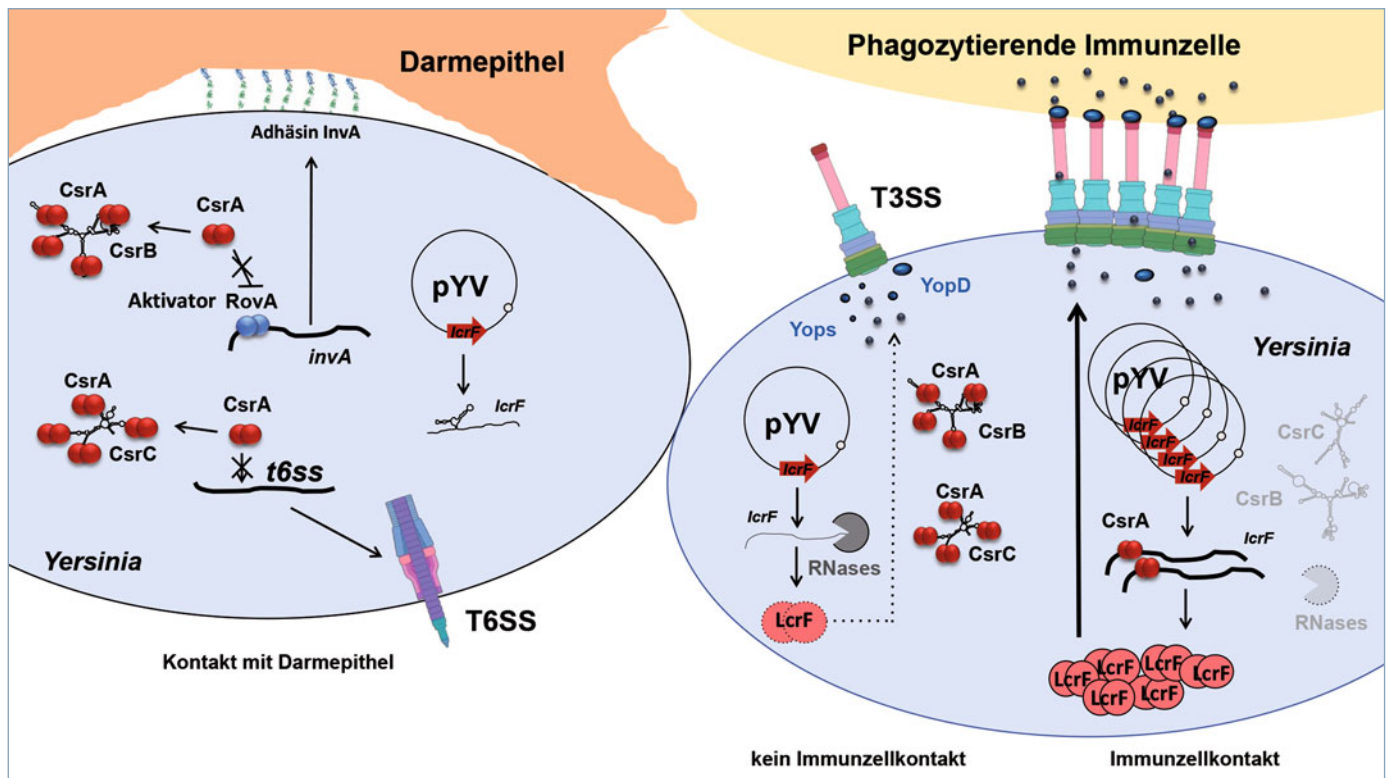
Da für alle Infektionsphasen ein bestimmtes Set an Virulenz- und Fitness-relevanten

Mechanismen benötigt wird, haben die *Yersinien* ein komplexes Kontrollnetzwerk entwickelt, das eine Infektionsphasen-angepasste Expression der notwendigen Virulenzstrategien ermöglicht. RNA-Sequenzierungsverfahren, die uns erlauben, das Transkriptom einer bakteriellen Population in Kultur, in Zellen bzw. im Gewebe während der Infektion (*tissue dual-RNA-Seq*) zu bestimmen, ermöglichten uns diverse RNA-basierte Kontrollmechanismen zu identifizieren, die für die Virulenz der Bakterien essenziell sind [1, 2, 3]. Weitere RNA-Seq-basierte Verfahren, die in Kooperation mit Franz Narberhaus (Universität Bochum) entwickelt wurden, erlaubten uns zudem, thermosensitive RNA-Strukturen der Bakterien zu identifizieren (*RNA structurome*) [4, 5]. Solche RNA-Thermometer reagieren sehr sensibel auf Temperaturveränderungen – wie beim Eintritt des Bakteriums von der Umwelt in den Wirt – und modulieren entsprechend die Expression der kontrollierten Virulenzgene.

Hieraus wurde deutlich, dass die Kontrolle der bakteriellen Virulenz viel komplexer ist als ursprünglich angenommen. Sie unterliegt



▲ **Abb. 1:** Infektionsphasen enteropathogener *Yersinien*. In der Kolonisationsphase sind die Bakterien motil und produzieren Adhäsions-/Invasionsfaktoren, um das Darmepithel zu durchdringen. In der nächsten Phase verlieren sie ihre Motilität und produzieren Immunabwehrfaktoren, wie das Yop-injizierende T3SS. EM-Aufnahmen von M. Rohde, HZI; Balken = 1 µm; entworfen mit [www.biorender.com](http://www.biorender.com).



▲ **Abb. 2:** RNA-basierte Kontrollmechanismen zur Steuerung der Virulenzgenexpression. Bei der Kolonisation (links) ist die Expression des Virulenzregulators *LcrF* durch das RNA-Thermometer reprimiert und es erfolgt die Expression des Adhäsins *InvA* und des T6SS mittels des Csr-Systems. In der Immunabwehrphase (rechts) ist das RNA-Thermometer entfaltet und die Csr-RNAs und RNasen sind reduziert, es kommt zur Synthese von *LcrF* und des T3SS/Yop-Systems das für die Eliminierung von Immunzellen essenziell ist. Teilweise entworfen mit [www.biorender.com](http://www.biorender.com).

nur selten einer rein transkriptionellen Kontrolle, sondern wird häufig zudem auf mehreren Ebenen durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Dieser Prozess involviert diverse RNA-Elemente, wie RNA-Thermometer sowie *cis*- und *trans*-agierende nicht-codierende RNAs, die spezifische Virulenzsysteme kontrollieren. Diese wiederum werden durch übergeordnete Riboregulatoren (globale RNA-Bindeproteine, RNasen) reguliert und zu komplexen regulatorischen Netzwerken zusammengefügt [6]. Dies ermöglicht, dass in den Bakterien bei plötzlichen Veränderungen im Infektionsverlauf, z. B. beim Übergang vom Darmtrakt in das lymphatische Gewebe (**Abb. 1**), eine Umprogrammierung erfolgen kann, die nicht nur die Expression der Pathogenitätsfaktoren, sondern auch den gesamten Metabolismus, die bakterielle Physiologie und Stressantwort an die neue Wirtsumgebung anpasst.

### Globale Riboregulation in *Yersinia*

Ein globales Kontrollsystem, das für die *Yersinia*-Virulenz essenziell ist, ist das *carbon storage regulatory* (Csr)-System. Es besteht aus dem RNA-Bindeprotein CsrA und zwei regulatorischen RNAs, CsrB und CsrC. CsrA

erkennt kurze GGA-Motive in *loops* von *hairpin*-Strukturen der Zieltranskripte. Überlappt eine Bindestelle mit der Ribosomenbindestelle, wird die Translation der mRNA unterdrückt. Diese Repression kann jedoch schnell wieder aufgehoben werden, wenn eine oder beide Csr-RNAs in größeren Mengen exprimiert werden. CsrB und CsrC bilden mehrere GGA-haltige *hairpin*-Strukturen aus, mit welchen sie CsrA-Dimere binden und von Zieltranskripten wegfangen können.

In unseren Studien haben wir festgestellt, dass das Csr-System – im engen Zusammenspiel mit RNasen – die Expression essenzieller *Yersinia*-Pathogenitätsfaktoren kontrolliert (**Abb. 2**, [6]). Dabei korreliert es die Produktion der Virulenzfaktoren mit der Synthese von metabolischen und physiologischen Prozessen und adaptiert sie auf unterschiedliche Infektionsphasen. Zu Beginn der Infektion steuert das Csr-System die Synthese von Adhäsionsfaktoren, die für die Bindung und den Durchtritt der Darmepithelschicht notwendig sind [6], und die Produktion von Typ-VI-Sekretionssystemen, mit deren Hilfe Effektorproteine in konkurrierende Bakterien der Mikrobiota injiziert werden, um diese zu eliminieren [7].

Nach der Einwanderung in die darmassoziierten lymphatischen Gewebe erfolgt durch eine Reduktion beider Csr-RNAs ein schnelles Ausschalten der Kolonisationsfaktoren und parallel eine Induktion einer Immunabwehr durch das Bakterium. Diese wird vor allem durch ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) vermittelt, das *Yersinia outer proteins* (Yops) in angreifende phagozytierende Immunzellen (Neutrophile/Makrophagen) injiziert (**Abb. 2**). Dadurch wird die Phagozytose gestoppt und der Zelltod der Phagozyten auslöst. Das Csr-System agiert dabei auf zwei Ebenen: (1) Es stabilisiert das Transkript des Hauptregulators *LcrF* des T3SS/Yop-Apparats und (2) aktiviert dessen Translation. Da die Menge beider Csr-RNAs auch durch die Injektion der Yop-Proteine beeinflusst wird, ist die T3SS/Yop-Synthese direkt an den Wirtszellkontakt gekoppelt (**Abb. 2**, [8]).

### Spezifische RNA-basierte Virulenzkontrollsysteme

Neben den übergeordneten RNA-vermittelten Kontrollsystemen wurde eine Vielzahl von RNA-Elementen gefunden, die die Synthese von spezifischen *Yersinia*-Virulenzfaktoren kontrolliert. Darunter sind temperatur-

sensitive Abschnitte der mRNA wichtiger Virulenzfaktoren, wie das Toxin CNF<sub>Y</sub> und der T3SS/Yop-Regulator LcrF (Abb. 2, [4, 5, 9]). Bei moderaten Temperaturen in der Umwelt verhindert die Ausbildung von komplexen RNA-Strukturen die Produktion dieser Faktoren, wohingegen diese bei etwa 37 °C aufschmelzen und die Transkripte translatiert werden. Die RNA-Thermometer sind dabei optimal an den Bedarf angepasst. Dies wird deutlich durch Bakterien mit modifizierten LcrF- und CNF<sub>Y</sub>-RNA-Thermometern, die nicht mehr in der Lage sind, Mäuse krank zu machen.

Zu den spezifischen *Yersinia*-RNA-Regulatoren zählt aber auch die *antisense*-RNA-CopA. Diese kleine RNA basenpaart mit dem *repA*-Transkript und blockiert dadurch die Synthese der Replikase des *Yersinia*-Virulenzplasmids auf dem die T3SS- und *yop*-Gene codiert sind. Wie durch *tissue dual*-RNA-Seq gezeigt wurde, ist die Expression von *copA* in Bakterien im darmassoziierten Gewebe gegenüber Bakterien im Kulturmedium deutlich reduziert [3]. Dadurch wird die Kopienzahl des Virulenzplasmids um das Vierfache erhöht und die T3SS/*yop*-Genexpression deutlich gesteigert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein großes Repertoire an RNA-basierten Kontrollstrategien in *Yersinia* entdeckt wurde. Obwohl wir von einigen wissen, dass sie ausgeklügelte Kontrollelemente für die Ausprägung von Virulenzfaktoren sind, steckt unser Wissen von vielen der entdeckten Systeme noch in den Kinderschuhen. Ihre weitere Erforschung könnte nicht nur unsere Kenntnisse über die Kontrolle von Wirt-Pathogen-Interaktionen stärken, sondern auch alternative Möglichkeiten aufzeigen, um Infektionen zu bekämpfen. ■

## Literatur

- [1] Nuss A, Heroven AK, Waldmann B et al. (2015) Transcription profiling by RNAseq reveals Crp as master regulator of small regulatory RNAs in *Yersinia pseudotuberculosis* PLoS Genetics 11:e1005087
- [2] Nuss A, Beckstette M, Pimenova M et al. (2017) Tissue dual RNA-seq allows fast discovery of infection-specific functions and riboregulators shaping host-pathogen transcriptome. Proc Natl Acad Sci USA 114:E791–E800
- [3] Schmühl C, Beckstette M, Heroven AK et al. (2019) Comparative transcriptomic profiling of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:8 reveals major expression differences of fitness- and virulence relevant genes indicating ecological separation. mSystems 4:e00239–18
- [4] Righetti R, Nuss AM, Twittenhoff C et al. (2016) The temperature-responsive RNA structure of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 113:7237–7242
- [5] Twittenhoff C, Brandenburg V, Righetti F et al. (2020) Lead-seq: transcriptome-wide structure probing *in vivo* using lead(ii) ions. Nucleic Acid Res 48:e71
- [6] Nuss AM, Heroven AK, Dersch P (2017) Riboregulators: formidable regulators of *Yersinia* virulence. Trends Microbiol 25:19–34

- [7] Knittel V, Sadana P, Seekircher S et al. (2020) RovC, a novel type of hexameric transcriptional activator promoting type VI secretion gene expression. PLoS Pathogens 16:e1008552
- [8] Kusmirek M, Hoßmann J, Witte R et al. (2019) PLoS Pathogens 15:e1007813
- [9] Twittenhoff C, Heroven AK, Mühlen S et al. (2020) An RNA thermometer dictates production of a secreted bacterial toxin. PLoS Pathogens 16:e1008184

**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. Petra Dersch  
 Institut für Infektiologie  
 Universität Münster  
 Von-Esmarch-Straße 56  
 D-48149 Münster  
 petra.dersch@uni-muenster.de

## AUTOREN



### Anne-Sophie Stolle

2007–2011 Bachelorstudium Biologische Chemie, Hochschule Mannheim. 2011–2013 Masterstudium Molekulare Biomedizin mit anschließender Promotion am Institut für Infektiologie bei Prof. Dr. M. A. Schmidt, Universität Münster. 2017–2019 Postdoktorandin an der Harvard Medical School, Boston, USA, im Labor von Prof. Dr. J. Mekalanos. Seit 2019 Postdoktorandin im Institut für Infektiologie, Universität Münster.



### Marcel Volk

2011–2016 Biologiestudium an der Universität Gießen. Seit 2016 Promotion am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, und am Institut für Infektiologie, Universität Münster.



### Inga Benz

1976–1885 Studium der Biologie an der Universität Heidelberg mit anschließender Promotion am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung bei Prof. Dr. H. Hoffmann-Berling. 1986–1992 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg bei Prof. Dr. M. A. Schmidt. Seit 1991 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Infektiologie, Universität Münster.



### Ileana Salto

2002–2018 Studium der Biotechnologie und Molekularbiologie an der Universität La Plata, Argentinien, mit anschließender Promotion und Postdoktorandin bei Prof. Dr. M. Pistorio und Prof. Dr. C. Muglia. 2018–2019 Gastwissenschaftlerin am Institut für Med. Mikrobiologie, Universität Münster, bei Prof. Dr. C. Strassert. Seit 2020 Postdoktorandin am Institut für Infektiologie, Universität Münster.



### Petra Dersch

1984–1995 Studium der Biologie an den Universitäten Ulm und Konstanz, mit anschließender Promotion am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, bei Prof. Dr. E. Bremer. 1995–1998 Postdoktorandin an der Tufts University, Boston, USA, im Labor von Prof. Dr. R. Isberg. 1998–2002 Gruppenleiterin, FU Berlin. 2003–2005 Nachwuchsgruppenleiterin am Robert-Koch-Institut. 2005–2008 W2-Professur für Mikrobiologie an der TU Braunschweig. 2008–2019 Leiterin der Abteilung Molekulare Infektionsbiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, W3-Professur für Mikrobiologie an der TU Braunschweig. Seit 2019 W3-Professorin und Leiterin des Instituts für Infektiologie, Universität Münster.