

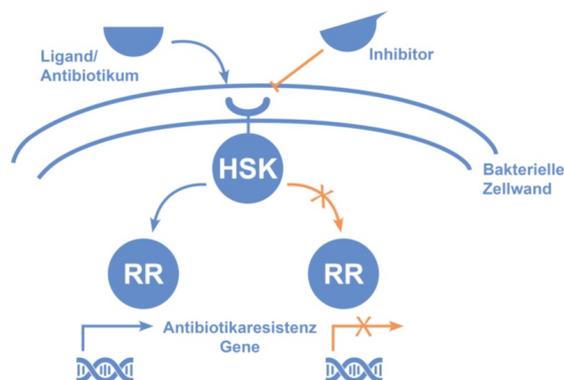
## Modulierung der Antibiotikaresistenz in *Pseudomonas aeruginosa* (MAPA)

Dr. Pierre Stallforth, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut (HKI) Jena

### 1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

**Ziel dieses interdisziplinären Projekts ist es, Liganden und/oder Inhibitoren der Rezeptoren von Zweikomponenten-Systemen in *P. aeruginosa* zu identifizieren, um durch deren gezielte Modifikation die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber Antibiotika zu erhöhen.**

Die komplexen zellulären Signalnetzwerke in humanpathogenen Mikroorganismen sind erst in Ansätzen verstanden. Bakterien können Umweltveränderungen mittels bestimmter Signaltransduktionswege erkennen und ihr Genexpressionsprofil entsprechend anpassen. Eines dieser klassischen Signaltransduktions-Systeme ist das Zweikomponentensystem (*two component systems* TCS, **Abb. 1**), welches aus einem Rezeptor (Histidin-Sensorkinase, HSK) und einem Transkriptionsfaktor (Response-Regulator, RR) besteht. Gram-negative Bakterien, wie *Pseudomonas* sp., besitzen zahlreiche TCS, die unter anderem für die Erkennung von Antibiotika notwendig sind und die Transkription von Resistenzgenen induzieren können.<sup>1-3</sup> Unsere Vorarbeiten sowie publizierte Studien zeigten zudem, dass spezifische Mutationen, welche TCS inaktivieren, eine veränderte Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber Antibiotika erzeugen.<sup>4-8</sup> Damit wird eine gezielte Suche nach Inhibitoren dieser TCS ermöglicht und bietet eine erfolversprechende Basis, um Kombinationstherapien gegen *P. aeruginosa*,



und andere Gram-negative Bakterien zu entwickeln. Ziel der Arbeit ist es die HSK Mutanten bezüglich der Produktion differentiellen Produktion von Sekundärmetaboliten zu charakterisieren (im Vergleich zu Wildtyp *P. aeruginosa*) um eventuelle autokrine Signalstoffe zu finden, die durch die entsprechenden HSK reguliert werden.

**Abbildung 1.** Liganden (z. B. Antibiotika) binden an Histidin-Sensorkinasen (HSK), die mittels eines Transkriptionsfaktors (Response-Regulator, RR) Antibiotikaresistenz-Gene aktivieren (links). Eine Inhibition des entsprechenden regulatorischen Systems (rechts) führt dazu, dass Resistenzgene nicht exprimiert werden, obwohl der Ligand oder das Antibiotikum vorliegt.

### 2. Resultate

Zu Beginn der Arbeit musste eine robuste Methode entwickelt und etabliert werden, um die HSK Mutanten bezüglich ihrer differentiellen Produktion ausgewählter Sekundärmetaboliten/Signalstoffen zu charakterisieren. Es wurde eine Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie basierte (LCMS) Quantifizierungsmethode etabliert, um die Produktion dieser Stoffe in Flüssigkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* zu bestimmen. Dies erlaubte es die Produktion der Stoffe Pyochelin, HHQ und PQS in Wildtyp vs. TCS Null-Mutanten zu ermitteln. Die entsprechenden Verbindungen wurden

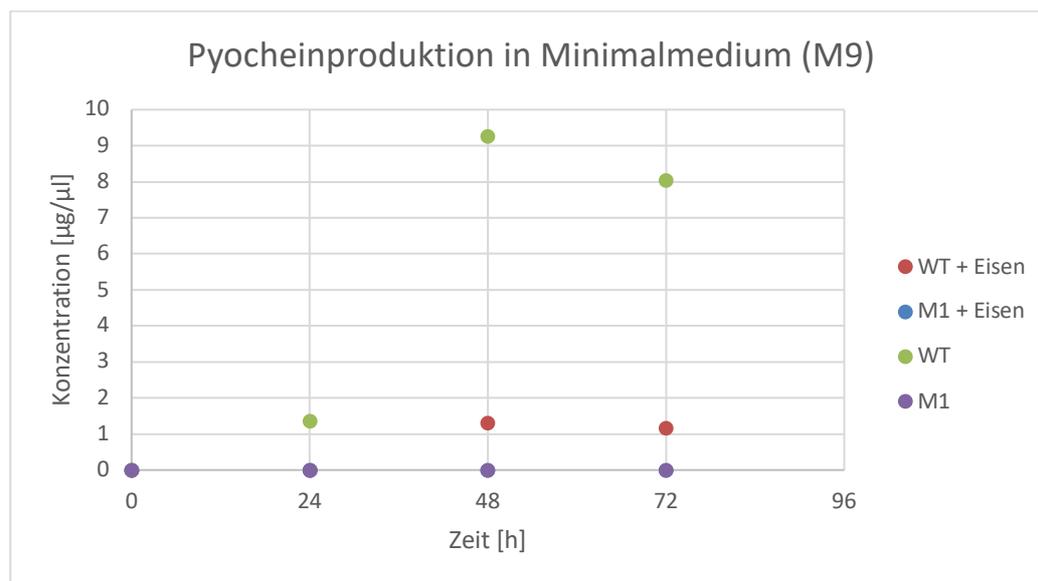
dafür aus Flüssigkulturen von *P. aeruginosa* isoliert und als Standard für eine Eichkurve für die LCMS-basierte Quantifizierung verwendet.

Es wurden anschließend Stämme aus der TCS-Mutantenbibliothek in diversen Nährmedien kultiviert und die Produktion von Pyochelin, HHQ und PQS nach Inkubation für 0h, 24h, 48h und 72h bei 37 °C bestimmt. Zudem wurde systematisch untersucht, ob die Eisenkonzentration im Medium einen Einfluss auf die Produktion der Metaboliten hat.

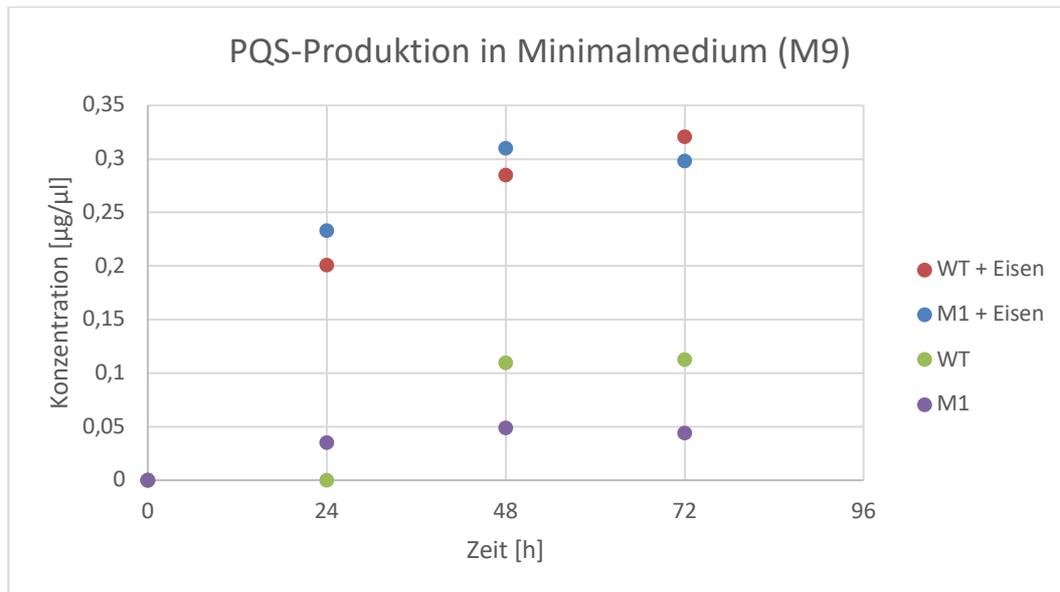
Nach systematische Untersuchung aller Mutanten, konnte eine solche (M1) identifiziert werden, deren Pyochelinproduktion sich stark von der des *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyp unterscheidet.

Mutante M1 zeigt einen deutlichen Phänotyp in der Pyochelin Produktion:

- Pyochelinproduktion ist im *P. aeruginosa* Wildtyp abhängig von der Eisenkonzentration
- Pyochelinproduktion ist im *P. aeruginosa* sowohl in Vollmedium als auch in Minimalmedien zu sehen
- Die Mutante M1 produziert in keinen Medien Pyochelin
- Die Mutante M1 und der Wildtyp unterscheiden sich kaum in der Produktion von HHQ
- Die Mutante M1 und der Wildtyp unterscheiden sich kaum in der Produktion von PQS



**Abbildung 2.** Zeitabhängige Pyochelinproduktion in WT und Mutante M1.



**Abbildung 3.** Zeitabhängige PQS-Produktion in WT und Mutante M1.

Abbildungen 2 und 3 sind ausgewählte Beispiele von zeitabhängiger Produktion von Sekundärmetaboliten in einer HSK Mutante und WT unter diversen Bedingungen.

### 3. Literatur

- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Méjean V, Foglino M. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **2000**, 8, 498-504.
- Gooderham W J, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* **2009**, 33, 279-294.
- Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, Oliver A. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation supply rates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016** pii: AAC.02676-15.
- Perron K, Caille O, Rossier C, van Delden C, Dumas JL, Kohler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 8761-8768.
- Mikkelsen H, Ball G, Giraud C, Filloux A. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators. *PLoS ONE.* **2009**, 4, e6018.
- Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R, Slatculescu C, Colavita A, Mah TF. Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS ONE* **2013**, 8, e61625.
- Zamorano L, Moya B, Juan C, Mulet X, Blazquez J, Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to  $\beta$ -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, 5084-5095.
- Kreamer NN, Costa F, Newman DK. The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. *MBio* **2015**, e02549-14.