

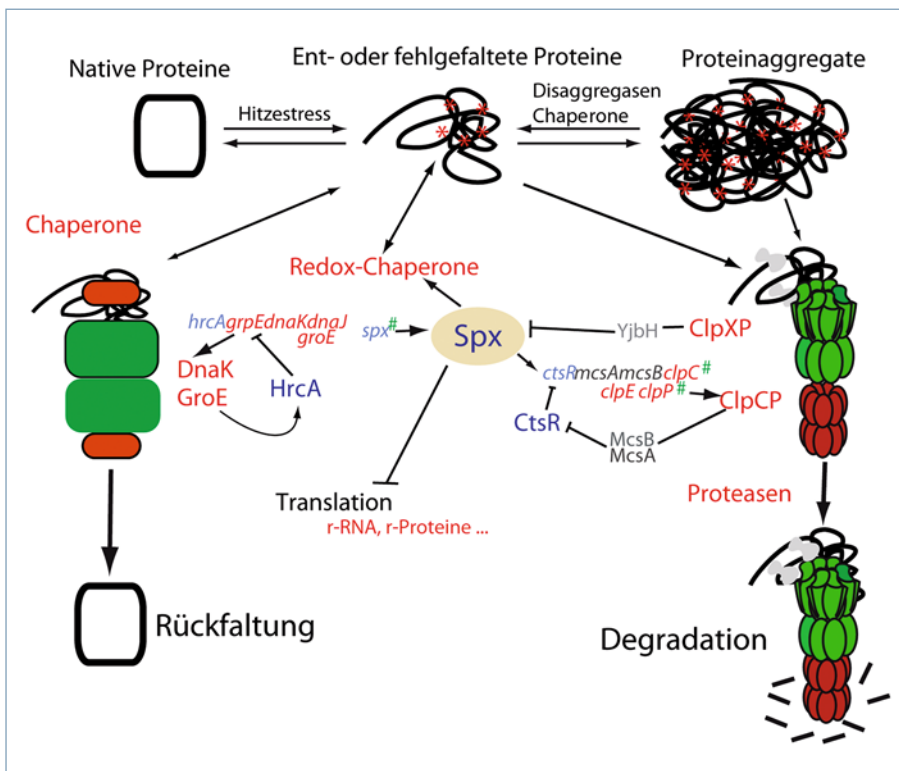
Bakterielle Stressantwort

Das stressige Leben des *Bacillus subtilis*

INGO HANTKE, HEINRICH SCHÄFER, REGINA KRAMER, KÜRŞAD TURGAY
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT HANNOVER

Here we present *Bacillus subtilis* as a model system to study protein homeostasis and protein quality control in conjunction with the different layers of its stress response systems. We established a new marker to study protein aggregation *in vivo*. Furthermore, we observed that the transcription factor Spx, which has already been characterized as a central player to activate transcription of redox-chaperones during heat shock and oxidative stress response, was also able to simultaneously inhibit the transcription of translation-related genes as a second response to stress.

DOI: 10.1007/s12268-019-1023-0
© Springer-Verlag 2019



▲ **Abb. 1:** Übersicht der Proteinqualitätskontroll- und Stressantwortssysteme in *Bacillus subtilis*. Fehlgefaltete Proteine können sowohl durch Chaperone repariert (Rückfaltung) als auch durch Proteasen abgebaut werden (Degradation). Spx ist als globaler Regulator bei Hitze und oxidativem Stress in alle Prozesse involviert, hemmt dabei zusätzlich die Translation. Regulatoren sind blau, Adapter grau, Proteasen und Chaperone rot dargestellt. #: Teil des generellen σ^B -Stressregulons.

■ Alle Organismen sind in ihrer Umgebung verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt. Insbesondere schnelle und oft drastische Änderungen abiotischer Faktoren, wie Temperatur, Wasser, Salz- und wechselnde Sauerstoffkonzentrationen, können z. B. Proteinentfaltung, -oxidation, Schäden an der DNA/RNA oder Membranstruktur hervorrufen. Die Grundprinzipien der zellulären Stressantwort sind aufgrund der Ähnlichkeiten möglicher Schäden und deren Auswirkungen auf zelluläre Grundfunktionen stark konserviert.

Ein wichtiger Aspekt zellulärer Stressantwort ist die Kontrolle der Proteinhomeostase. Daher ist ein funktionales Proteinqualitätskontrollsystem (PQK) von entscheidender Bedeutung. Hierbei kann die Proteinhomeostase grundsätzlich durch zwei Strategien gewährleistet werden: Zum einen reparieren Chaperone wie Hsp70/DnaK fehlgefaltete Proteine und disaggregieren potenziell toxische Proteinaggregate. Zum anderen werden entfaltete und falsch gefaltete Proteine durch Proteasekomplexe, z. B. Hsp100/ClpCP, degradiert und entfernt. Diese in **Abbildung 1** am Beispiel von *Bacillus subtilis* dargestellten Mechanismen sind ubiquitär und in allen Organismengruppen konserviert [1, 2].

Stressantwort und Proteinaggregate in *Bacillus subtilis*

Als Bodenorganismus muss *B. subtilis* schnell auf Veränderungen der Umgebung reagieren. Der Gram-positive Modellorganismus eignet sich daher gut für die Erforschung des PQK und der bakteriellen Stressantwort. Während oft versucht wird, verschiedene Arten von Stress im Labor separat zu untersuchen, hängen sie in der Natur meist zusammen und treten gemeinsam auf, beispielsweise hohe Temperaturen, UV-Strahlung, Trockenheit und ein damit verbundener Anstieg der Salzkonzentration an einem heißen Sommertag. Daher hat *B. subtilis* wie alle Bakterien im Laufe der Evolution generelle, aber auch spezifische Systeme der Stressantwort entwickelt [2, 3].

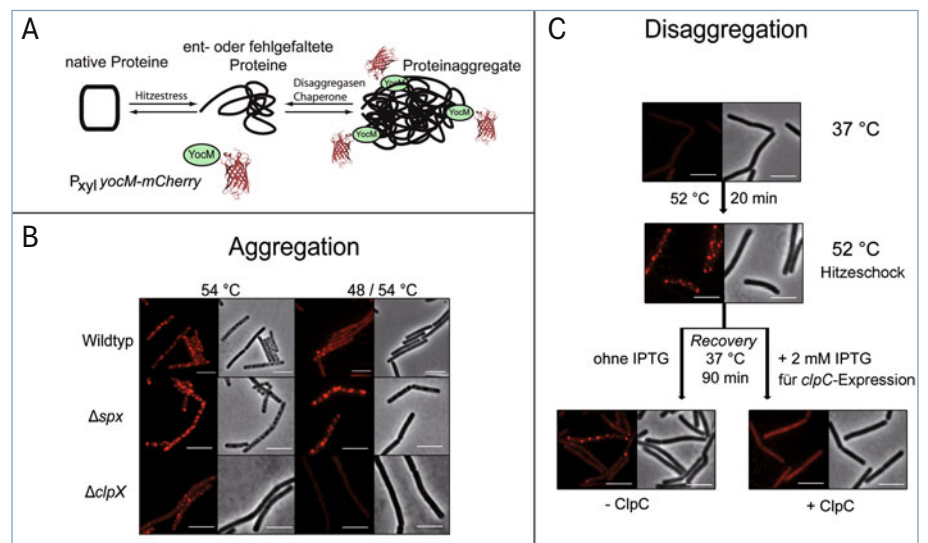
Interessanterweise können *B. subtilis*-Zellen verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften ausbilden. Darunter finden sich z. B. Biofilm-bildende oder sporulierende Zellen. Auch die natürliche Kompetenzentwicklung zur Aufnahme von exogener DNA ist eine Form der Stressantwort. Diese verschiedenen Strategien erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass eine der Subpopulationen den möglicherweise aufkommenden Stress übersteht, und können so das Überleben der Gesamtpopulation gewährleisten [4, 5].

Kürzlich etablierten wir einen neuen Marker für subzelluläre, unlösliche Proteinaggregate, die sich beispielsweise bei Hitzestress im Cytoplasma anreichern. Das kleine Hitzeschockprotein (sHsp) YocM, das *B. subtilis*-Zellen bei Salzstress schützt, kann – fusioniert an einen Fluoreszenzmarker – intrazelluläre Aggregate sichtbar machen (Abb. 2, [6]). So lassen sich verschiedene Mutationen im POK einfach und schnell auf deren Auswirkung auf die stressinduzierte Bildung von toxischen Proteinaggregaten der Zellen testen [6]. Neben der Entstehung von unlöslichen Aggregaten lässt sich so auch deren Auflösung bzw. Disaggregation *in vivo* verfolgen.

Eine spezifische Disaggregase wie ClpB aus *Escherichia coli* existiert in *B. subtilis* nicht, allerdings kann hier die AAA+-ATPase ClpC unlösliche aggregierte Proteine voneinander lösen, entfalten und dadurch zurück in die native Konformation leiten, im Komplex mit der Protease ClpP aber auch abbauen. Diese Auflösung von Proteinaggregaten, die entweder zur Rückfaltung oder zur Degradation führen kann, wurde in *B. subtilis* bisher nur *in vitro* mit Modells substraten untersucht. Es gab bereits deutliche Hinweise, dass diese ClpC-Aktivitäten von Adapterproteinen abhängig sind [1, 7]. Der neu etablierte *in vivo*-Disaggregationsassay (Abb. 2) soll nun zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Regulation und Relevanz von Disaggregation und Degradation innerhalb des POK bringen.

Spx, ein Protein mit vielen Facetten

Interessanterweise zeigte sich, dass ein Stressantwortsystem in mehrere Strategien involviert sein kann. Ein Beispiel ist Spx, ein zentraler Regulator bei der spezifischen Antwort auf Thiol- und oxidativen Stress. Zusätzlich spielt Spx eine wichtige Rolle in der Hitzeschockantwort [8]. Wir konnten zeigen, dass Spx für die Ausbildung von Thermotoleranz von entscheidender Bedeutung ist. Thermo-



▲ **Abb. 2:** Hitzestress führt zur Denaturierung von Proteinen. **A**, Schema zur Hitzedenaturierung. Ent- oder fehlgefaltete Proteine können daraufhin zu unlöslichen Proteinaggregaten führen. Diese Proteinaggregate werden durch Anlagerung des kleinen Hitzeschockproteins YocM fusioniert mit mCherry im Fluoreszenzmikroskop *in vivo* sichtbar gemacht. **B**, Hitzesensitivere (Mitte, Δspx) bzw. resistere (unten, $\Delta clpX$) Stämme akkumulieren nach Hitzeschock (Prä-Schock: 15 min., 48 °C + 54 °C) mehr bzw. weniger YocM-mCherry-markierte Aggregate als der Wildtypstamm (oben). **C**, In einer $\Delta clpC$ -Mutante beschleunigt die Synthese von ClpC (+ IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) nach einem kurzzeitigen Hitzeschock (20 min., 52 °C) die Auflösung von Proteinaggregaten (modifiziert aus [6]).

tolerante Zellen überleben eigentlich tödlichen Hitzestress durch eine Adaptation während eines kurzen, nicht letalen Prä-Schocks. Währenddessen kommt es in den Zellen zu einer Hochregulation von Genen des POK, die durch globale und spezifische Regulatoren wie CtsR, HrcA, σ^B und Spx kontrolliert werden und dabei helfen, toxische Proteinaggregate zu verhindern und zu beseitigen (Abb. 1, Abb. 2, [3]). Dieses *priming* schützt auch gegen andere Typen von Stress. So kann ein Prä-Schock durch eine erhöhte Salzkonzentration auch vor einem letalen Hitzeschock schützen, was den Zusammenhang zwischen verschiedenen abiotischen Stressfaktoren und die Zusammenarbeit der Stressantwortssysteme nochmal verdeutlicht.

Kürzlich stellte sich heraus, dass die Rolle von Spx *in vivo* deutlich vielschichtiger ist als bisher angenommen. Als ungewöhnlicher Regulator, der *per se* kein DNA-Bindemotiv besitzt und stattdessen mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (α -CTD) interagiert [9], bindet Spx Sequenzen *upstream* von vielen Promotoren im Genom von *B. subtilis* und aktiviert die Transkription von Genen der Stressantwort etwa auf Hitze, Kälte, Salz, oxidativen Stress oder Zellwandantibiotika [10]. In diesen Systemen der Stressantwort ist Spx oft zusammen mit anderen Stressregulatoren, wie σ^B ,

CtsR und HrcA, aktiv (Abb. 1). Wir konnten durch Mikroarrays und RT-qPCR zeigen, dass Spx zusätzlich spezifisch Gene ribosomaler Proteine sowie ribosomaler RNA herunterregulieren kann [11]. Dadurch wird die Neusynthese von Ribosomen und in letzter Konsequenz die Translation in der Zelle reduziert. Dies zeigt, dass *B. subtilis*, wie andere Organismen, gleichzeitig mehrere ähnliche, aber auch sich ergänzende Strategien der Stressantwort verfolgt. Während Chaperone durch mehrere Stressantwortssysteme hochreguliert werden, wird die Neusynthese von Proteinen heruntergefahren und dadurch gleichzeitig die Last auf das POK verringert.

Vielseitige Mechanismen – ein Ziel

Die Stressantwort von *B. subtilis* ist bereits ausgiebig erforscht, und dennoch ist dieses hochkomplexe System noch lange nicht vollständig verstanden. Es sind insbesondere die Vielfalt der möglichen beteiligten Regulationsnetzwerke sowie die Ähnlichkeit dieser verschiedenen Systeme, welche die Stressantwort robust und effizient gestalten, aber auch deren Untersuchung erschweren. Außerdem werden die in der Natur vorherrschenden Bedingungen im Labor oft separat untersucht. Dadurch erhofft sich (und erhält) die Forschung zwar genaue Einblicke in einen spezifischen Mechanismus, allerdings muss die

physiologische Bedeutung immer im Gesamtbild betrachtet werden. Ein gutes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor Spx: ein Regulator von Thiol- und oxidativem Stress, der zusätzlich wichtige Rollen in verschiedenen Regulationsnetzwerken, wie der Kompetenzentwicklung, spielt und darüber hinaus sogar eine generelle Inhibierung der Translation bei Stress mitbewirken kann [11].

Dies verdeutlicht, wie komplex, aber auch interessant und vielseitig die Mechanismen der bakteriellen Stressantwort sind. Dass eben solche ClpCP-vermittelte Mechanismen der POK und Stressantwort in den Fokus als mögliches Ziel für Antibiotika gerückt sind [12], zeigt dazu die Wichtigkeit des Verständnisses der Proteinqualitätskontrollsysteme über die Grundlagenforschung hinaus.

Danksagung

Die Arbeiten im Labor von Kürşad Turgay wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt. Ingo Hantke erhielt ein Stipendium der Hannover School for Biomolecular Drug Research (HSBDR). ■

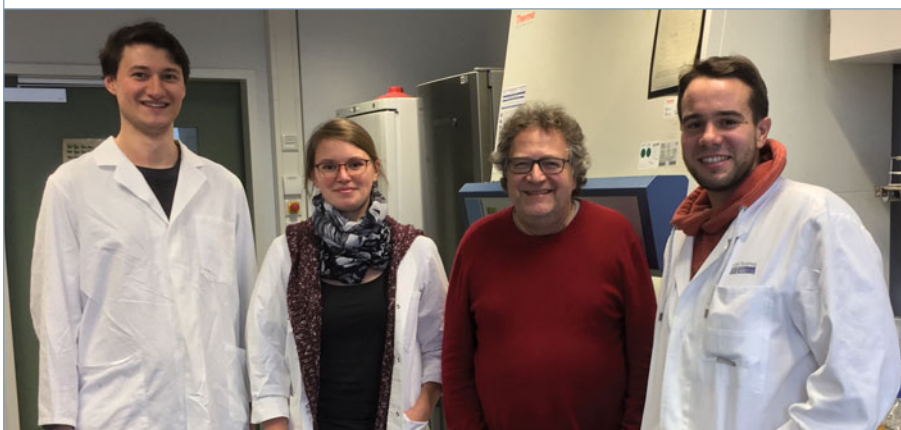
Literatur

- [1] Kirstein J, Molière N, Dougan DA et al. (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Microbiol* 7:589–599
- [2] Elsholz AKW, Birk MS, Charpentier E et al. (2017) Functional diversity of AAA+ protease complexes in *Bacillus subtilis*. *Front Mol Biosci* 4:44
- [3] Hecker M, Schumann W, Völker U (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417–428
- [4] Lopez D, Vlamakis H, Kolter R (2009) Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* 33:152–163
- [5] Veening JW, Smits WK, Kuipers OP (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 62:193–210
- [6] Hantke I, Schäfer H, Janczkowski A et al. (2018) YocM a small heat shock protein can protect *Bacillus subtilis* cells during salt stress. *Mol Microbiol* 111:423–440
- [7] Schlothauer T, Mogk A, Dougan DA et al. (2003) Meca, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2306–2311
- [8] Runde S, Molière N, Heinz A et al. (2014) The role of thiol oxidative stress response in heat-induced protein aggregate formation during thermotolerance in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 91:1036–1052
- [9] Nakano S, Nakano MM, Zhang Y et al. (2003) A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4233–4238
- [10] Rochat T, Nicolas P, Delumeau O et al. (2012) Genome-wide identification of genes directly regulated by the pleiotropic transcription factor Spx in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 40:9571–9583
- [11] Schäfer H, Heinz A, Sudzinová P et al. (2019) Spx, the central regulator of the heat and oxidative stress response in *B. subtilis*, can repress transcription of translation-related genes. *Mol Microbiol* 111:514–533
- [12] Culp E, Wright GD (2016) Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot (Tokyo)* 70:366–377

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Kürşad Turgay
Institut für Mikrobiologie
Leibniz Universität Hannover
Herrenhäuser Straße 2
D-30419 Hannover
Tel.: 0511-762-5241
turgay@ifmb.uni-hannover.de

AUTOREN



Heinrich Schäfer, Regina Kramer, Kürşad Turgay und Ingo Hantke (v. l. n. r.)

Ingo Hantke

2010–2015 Life-Science-Studium mit Schwerpunkt Molekularbiologie und Bioprozesstechnik an der Universität Hannover. Seit 2015 Doktorand am Institut für Mikrobiologie im Rahmen der Hannover School for Biomolecular Drug Research (HSBDR).

Heinrich Schäfer

2008–2013 Biologiestudium, Schwerpunkt Molekularbiologie und Biochemie an der Universität Greifswald. Seit 2013 Doktorand am Institut für Mikrobiologie an der Universität Hannover.

Regina Kramer

2010–2015 Pflanzenbiotechnologiestudium an der Universität Hannover. Seit 2015 Doktorandin am Institut für Mikrobiologie an der Universität Hannover.

Kürşad Turgay

Chemiestudium an der TU Berlin. 1991–1994 Promotion an der Universität Marburg bei Prof. Dr. M. Marahiel. 1995–1999 Postdoc am Public Health Research Institute in New York, USA, bei Prof. Dr. D. Dubnau. 1999–2004 Projektleiter bei Prof. Dr. B. Bukau an der Universität Freiburg und am ZMBH der Universität Heidelberg. 2004–2010 Juniorprofessor und 2010–2011 Heisenberg-Stipendiat der DFG an der FU Berlin. Seit 2011 Professor für Mikrobiologie (W2) an der Universität Hannover.