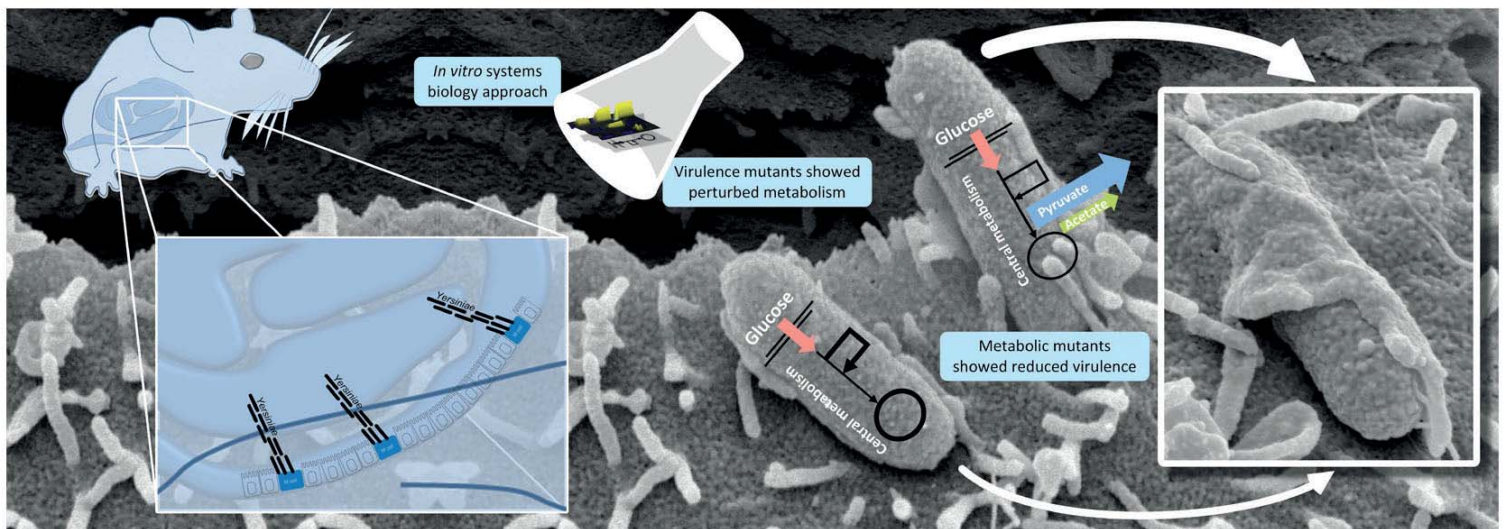




René Bückner

A multi-omics view on the pathogen *Yersinia pseudotuberculosis* – bridging metabolism and virulence



Hochschulschriften

Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

Band 2

**Cuvillier-Verlag
Göttingen, Deutschland**



Herausgeber
Univ.-Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes
Campus A1.5, 66123 Saarbrücken
www.iSBio.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Titelbild: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Prof. Dr. Manfred Rohde, Forschungsgruppe: Molekulare Mechanismen von Streptokokken, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2015

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2015
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten.

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2015
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-7369-9039-5
eISBN 978-3-7369-8039-6
ISSN 2199-7756



A multi-omics view on the pathogen
***Yersinia pseudotuberculosis* - bridging**
metabolism and virulence

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Ingenieurwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
René Bücken

Saarbrücken

2014



Tag des Kolloquiums:	07. November 2014
Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre
Berichterstatter:	Prof. Dr. Christoph Wittmann Prof. Dr. Petra Dersch
Vorsitz:	Prof. Dr. Elmar Heinzle
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Björn Becker

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

Bücker R, Heroven AK, Becker J, Dersch P, Wittmann C (2014) The pyruvate-tricarboxylic acid cycle node: a focal point of virulence control in the enteric pathogen *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Biol Chem* **289**: 30114-30132

Tagungsbeiträge

Bücker R, Dersch P, Wittmann C: Metabolic flux analysis of enteropathogenic *Yersinia pseudotuberculosis*, VAAM-Jahrestagung, April 2011, Karlsruhe, Germany

Bücker R, Becker J, Heroven AK, Dersch P, Wittmann C: Systems biology of the pathogenic bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*, VAAM-Jahrestagung, March 2012, Tübingen, Germany

Bücker R, Becker J, Heroven AK, Dersch P, Wittmann C: Interplay between carbon core metabolism and virulence in the human pathogenic bacterium *Yersinia pseudotuberculosis*, SPP 1316 Host-Adapted Metabolism of Bacterial Pathogens - 2. Statusseminar, October 2012, Obergurgl, Austria

Bücker R, Heroven AK, Becker J, Dersch P, Wittmann C: Combined fluxome and transcriptome profiling of *Yersinia pseudotuberculosis*, SPP 1316 Host-Adapted Metabolism of Bacterial Pathogens - ¹³C Metabolic Flux Analysis Workshop, February 2013, Braunschweig, Germany



MITWIRKUNG

Kooperationspartner

Dr. Ann Kathrin Heroven (Gruppe von Prof. Dr. Petra Dersch, Abteilung Molekulare Infektionsbiologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland) hat die gentechnischen Arbeiten, die Transkriptomanalysen und die Mausinfektionsexperimente durchgeführt.

Dr. Aaron Mischa Nuss (Gruppe von Prof. Dr. Petra Dersch, Abteilung Molekulare Infektionsbiologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland) hat die Western Blot Analysen und fluoreszenzgestützte Durchflusszytometrie der in Kapitel 5.3 gezeigten Experimente durchgeführt.

Studenten

Teile der in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse wurden von den nachfolgend aufgeführten Studenten unter Anleitung erarbeitet.

Tabea Rook hat im Rahmen ihrer Bachelorarbeit „Aufklärung metabolischer Stoffflüsse in *Yersinia pseudotuberculosis* unter Einfluss therapeutisch relevanter Antibiotika“ (2012) am Institut für Bioverfahrenstechnik in Braunschweig die Kultivierungen und die anschließende Analytik der in Kapitel 5.2 bearbeiteten Fragestellung durchgeführt.

Sandra Zimmermann hat im Rahmen ihrer Bachelorarbeit „Analyse der Bistabilität des temperaturabhängigen Virulenzfaktors RovA in *Yersinia pseudotuberculosis*“ (2012) am Institut für Bioverfahrenstechnik in Braunschweig Kultivierungen und Probenaufarbeitungen für die in Kapitel 5.3 bearbeitete Fragestellung durchgeführt.



DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Wittmann für die Betreuung und für die Übernahme des Referats bedanken. Ich habe es sehr geschätzt, dass es neben der sehr guten und intensiven Betreuung immer ausreichend Raum für eigene Ideen gab. Die daraus resultierende Mischung aus konstruktiver Anleitung und wissenschaftlicher Freiheit ist jedem Doktoranden zu wünschen.

Bei Prof. Dr. Petra Dersch bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats, die hervorragende Kooperation und die vielen konstruktiven Gespräche.

Bei Dr. Judith Becker bedanke ich mich für das stets offene Ohr, die vielen Ratschläge und den Anstoß zur Promotion in dieser Arbeitsgruppe.

Dr. Ann Kathrin Heroven und Dr. Aaron Mischa Nuss danke ich für die sehr gute Kooperation.

Yvonne Göcke, Elena Kempf, Sandra Hübner und Cord Hullmann möchte ich für die immer perfekt organisierten und einsatzbereiten Labore danken. Darüber hinaus war bei Problemen und Fragen immer einer von euch zur Stelle, besser geht es nicht.

Mein besonderer Dank gilt Detlev Rasch. Ohne deine handwerklichen Fähigkeiten und Verbesserungsvorschläge hätte ich viele Ideen nicht umsetzen können.

Meinen Studenten Sören Starck, Tabea Rook, Sandra Zimmermann, Lea Tchapchet und Sabine Will danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern des „SPP 1316: Wirtsadaptierter Metabolismus von bakteriellen Infektionserregern“ für die wissenschaftlichen Vorträge, Diskussionen sowie für die netten Runden im Anschluss danken.



Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Future Fund der TU Braunschweig danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Rudolf Schäfer danke ich für das geduldige Zuhören und Beratschlagen über das merkwürdige Verhalten pathogener Mikroorganismen sowie für die vielen technisch versierten Diskussionen, die auch mal über laborrelevante Themen hinausgingen.

Dem ganzen Team aus Braunschweig und Saarbrücken danke ich für die gute Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und für die vielen netten Abende. Ein ganz besonderes Highlight in fast jeder Woche war das gemeinsame Fußballspiel und der schön zelebrierte Videoabend. Suit up!

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mir den Weg bis zur Promotion so leicht wie möglich gemacht haben. Ich konnte immer auf eure volle Unterstützung bauen. Das werde ich euch nie vergessen.

Meinen Großeltern und meiner Schwester danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die motivierenden Worte. Ohne euch wäre das Leben nur halb so schön.

Am Ende möchte ich dir, der wichtigsten Person in meinem Leben, danken. Wir haben so ziemlich alles bis hierhin gemeinsam erlebt und dazu gehört nun auch die Promotion. Luise, ich danke dir für die vielen Aufmunterungen, für deine Geduld und für deine Hilfe in allen Lebenslagen.

**TABLE OF CONTENTS**

Summary	X
Zusammenfassung	XI
1 Introduction	1
2 Objectives	3
3 Theoretical Background	4
3.1 Clinical relevance of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	4
3.2 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> - Life style and infection process	5
3.3 Virulence promoting metabolism of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	9
3.4 Metabolism as part of the resistome – the intrinsic bacterial resistance	12
3.5 Systems-level analysis of biological systems	13
3.6 Concept of ¹³ C metabolic flux analysis	16
4 Materials and Methods	19
4.1 Bacterial strains and mutant construction	19
4.2 Cultivation	23
4.2.1 Strain conservation	23
4.2.2 Batch cultivation for metabolic flux analysis	23
4.2.3 Continuous cultivation for temperature shift experiments	23
4.3 Analytical methods	25
4.3.1 Glucose, organic acids, and amino acids	25
4.3.2 Cell concentration	25
4.3.3 GC-MS labeling analysis	26
4.3.4 Quantification of RovA by Western blot analysis	27
4.3.5 Quantification of RovA by fluorescence-activated cell sorting	28
4.4 Analysis of cellular composition of <i>Y. pseudotuberculosis</i>	28
4.4.1 Protein content and amino acid composition	28
4.4.2 RNA content and nucleotide composition	29
4.4.3 DNA content and nucleotide composition	29
4.4.4 Glycogen and Lipids	30
4.5 Gene expression profiling	30
4.5.1 Hierarchical clustering analysis	31
4.6 Metabolic flux analysis	32
4.6.1 Metabolic network and biomass requirements	32



TABLE OF CONTENTS

4.6.2	Metabolic flux calculation and statistical evaluation	32
4.7	<i>In vivo</i> mouse studies	33
4.7.1	Mouse infections	33
4.7.2	Ethics statement	34
5	Results and Discussion	35
5.1	Integration of virulence and metabolism - A systems biology approach	35
5.1.1	Glucose-grown <i>Y. pseudotuberculosis</i> secretes high amounts of pyruvate under fully aerobic conditions	35
5.1.2	Influence of the global regulators RovA, CsrA, and Crp on the growth behavior and overflow metabolism of <i>Y. pseudotuberculosis</i>	37
5.1.3	Metabolic and isotopic steady state – two important prerequisites for metabolic flux analysis	38
5.1.4	Cellular composition of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	40
5.1.5	Intracellular fluxes of glucose-grown <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> strongly differ from those of its relative <i>Escherichia coli</i>	42
5.1.6	The lack of RovA, CsrA, and Crp perturbs the intracellular carbon fluxes in <i>Y. pseudotuberculosis</i>	44
5.1.7	Mutants deficient in RovA, CsrA, and Crp reveal an altered expression pattern of virulence-associated, stress adaptation, and metabolic genes	46
5.1.8	The pyruvate-TCA cycle node as metabolic switch point of virulence ...	51
5.1.9	Perturbations of the metabolic core machinery at the pyruvate-TCA cycle node reduce <i>Yersinia virulence</i>	54
5.1.10	Post-transcriptional control of flux as a crucial strategy for virulence	57
5.1.11	The secretion of high amounts of pyruvate by <i>Y. pseudotuberculosis</i> is unique among pathogens	59
5.1.12	The pyruvate node and the TCA cycle are focal points of virulence control	60
5.2	Antibiotic treatment	63
5.2.1	Response of core metabolism to antibiotic treatment	63
5.2.2	Inherent erythromycin resistance of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> is accompanied by maintaining a highly active glycolysis	67
5.2.3	The high susceptibility for tetracycline is accompanied by the absence of major flux rerouting in <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	67
5.3	Control of virulence by temperature	70
5.3.1	Impact of temperature on virulence of <i>Y. pseudotuberculosis</i>	70
5.3.2	Development of a reactor setup for precise temperature profiles	70

VIII



5.3.3	Determination of an appropriate dilution rate for RovA synthesis	71
5.3.4	Temperature up-shift mimicking the entrance of <i>Y. pseudotuberculosis</i> into the host	72
5.3.5	Temperature down-shift mimicking release from the host.....	74
5.3.6	Fluorescence-activated cell sorting correlates with Western blot analysis	75
5.3.7	Silencing and activation of <i>rovA</i> transcription follow different kinetics...	75
5.3.8	Bistability can explain the observed RovA expression pattern	77
5.3.9	Does RovA expression fit with known models of bistability?	77
6	Conclusion and Outlook	81
7	Appendix	84
7.1	Abbreviations.....	84
7.2	Symbols.....	87
7.3	Data from ¹³ C metabolic flux analysis.....	88
7.4	Data from gene expression analysis.....	92
8	References	105



SUMMARY

Yersinia pseudotuberculosis is a human pathogen that causes acute intestinal and systemic diseases. This study investigated the link between pathogenic traits and the metabolic core machinery of *Y. pseudotuberculosis* using a systems biology approach: the integration of gene expression profiles with metabolic pathway fluxes in the wild type and virulence regulator mutants. The absence of specific virulence regulators particularly perturbed fluxes and gene expression of pyruvate metabolism and tricarboxylic acid cycle, suggesting an involvement of this metabolic node in the virulence management system. Mutants, genetically perturbed in regulators of this metabolic branch point and one of its central enzymes, showed a significant reduction of virulence in an oral mouse infection model. This revealed the pyruvate-TCA cycle node as a focal point for controlling host colonization. Flux rerouting was also identified as response to applied antibiotic therapies. The examination of *Yersinia's* fine-tuned adaptation was expanded to temperature, an important infection parameter, using a continuous culture with advanced temperature control to mimic the infection process. The virulence regulator RovA, known to respond to temperature and to control metabolic, stress, and virulence genes, was quantified by Western blot analysis and fluorescence-activated cell sorting. RovA showed a bistable behavior that generally maximizes survival by heterogeneity.

ZUSAMMENFASSUNG

Das humanpathogene Bakterium *Yersinia pseudotuberculosis* verursacht ernsthafte intestinale und systemische Erkrankungen. In dieser Arbeit wurde die Verknüpfung von Pathogenität und Metabolismus in *Yersinia pseudotuberculosis* unter Verwendung von Transkriptom- und metabolischen ^{13}C -Stoffflussanalysen untersucht. Virulenz-Regulator-Mutanten wiesen im Vergleich zum Wildtyp starke Veränderungen im Pyruvatmetabolismus und im Zitratzyklus auf. Die gezielte genetische Deregulation dieses Stoffwechselknotenpunktes führte zu Mutanten mit stark reduzierter Virulenz im Mausmodell. Der Pyruvat-Zitronensäure-Knoten konnte demnach als ein zentraler Punkt der Virulenzregulation identifiziert werden. Der Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Stoffflussverteilung wies darüber hinaus auf einen komplexen Zusammenhang von Metabolismus und inhärenter Resistenz hin. Die feinregulierte Anpassung des Organismus während der Infektion wurde weiterführend anhand des temperaturabhängigen Transkriptionsregulators RovA untersucht, der Gene des Metabolismus, der Stressantwort und des Virulenzprogramms der Zelle kontrolliert. Der Infektionsprozess wurde dazu in einer kontinuierlichen Kultur mit präziser Temperaturführung simuliert. Western Blot Analysen und fluoreszenzgestützte Durchflusszytometrie zeigten bistabiles Verhalten des Proteins RovA. Die daraus hervorgehende Heterogenität der Population kann die Überlebenswahrscheinlichkeit der Gesamtpopulation erhöhen.