

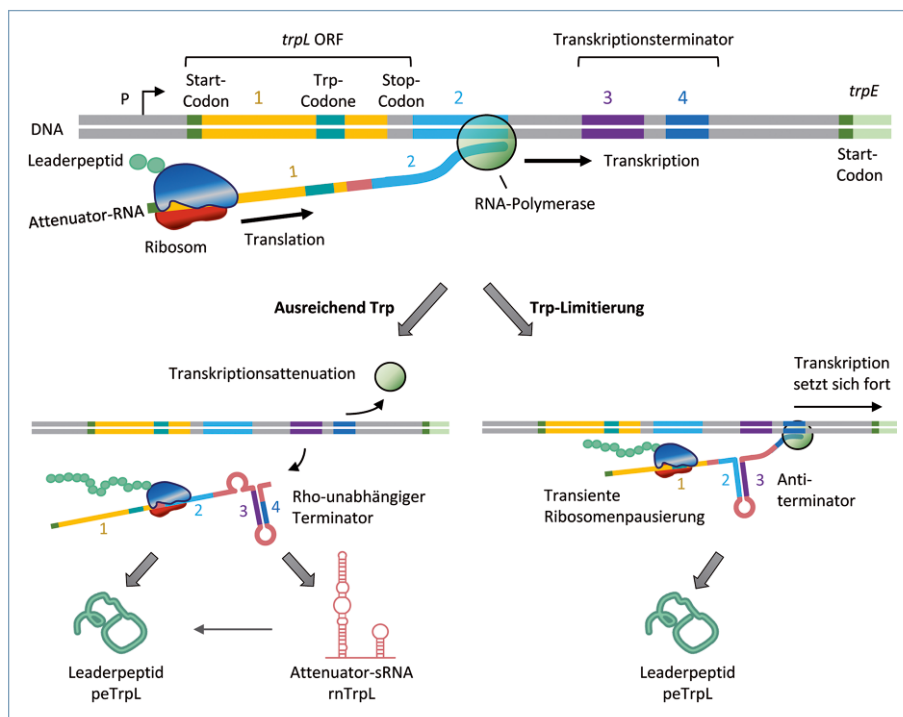
## RNA-Regulation und Antibiotikaresistenz

# Trans-agierende Attenuator-RNA und Leaderpeptid in Bakterien

HENDRIK MELIOR UND ELENA EVGUENIEVA-HACKENBERG  
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, UNIVERSITÄT GIESSEN

**Bacterial transcription attenuators are a source of small RNAs (sRNAs) and leader peptides, for which no own functions were known. However, the attenuator sRNA of the tryptophan (Trp) biosynthesis operon regulates gene expression in *trans* according to the Trp-availability. Moreover, the cognate leader peptide adopted Trp-independent functions. It builds antibiotic-dependent ribonucleoprotein complexes (ARNPs) for sRNA reprogramming and regulation of ribosomal and multiresistance genes.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1545-0  
© Die Autoren 2021

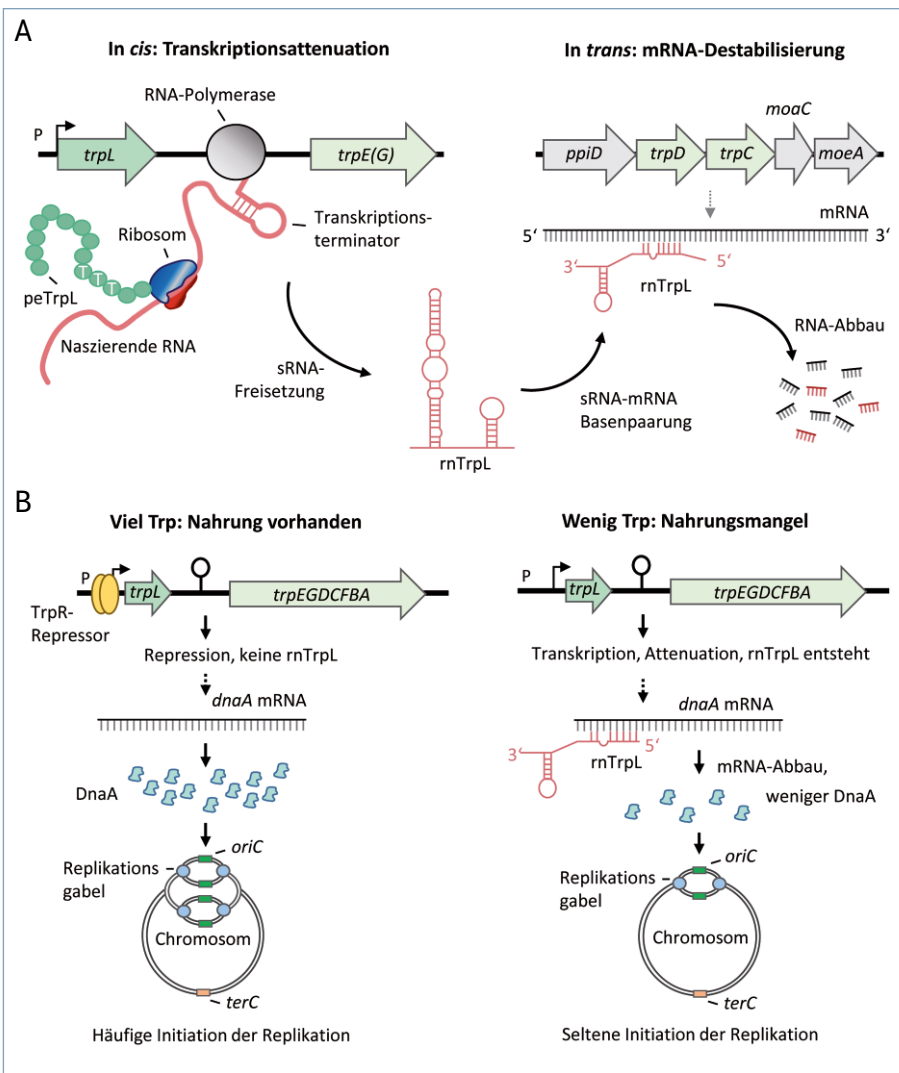


**▲ Abb. 1:** Transkriptionsattenuation am *trp*-Operon. Der Transkriptionsstart ist mit einem gebogenen, mit P (Promotor) markierten Pfeil dargestellt. Die farbigen markierten Regionen 1 bis 4 in der entstehenden RNA können alternative Sekundärstrukturen bilden. Bei ausreichender Trp-Versorgung wird *trpL* schnell translatiert. Das ermöglicht die Basenpaarung der Regionen 3 und 4 und hiermit die Transkriptionstermination. Dabei entstehen eine Attenuator-sRNA und das Leaderpeptid (unten links). Bei Trp-Limitierung verweilen die Ribosomen an den Trp-Codonen in *trpL*. Das führt zur Bildung des Antiterminators (die Basenpaarung der Regionen 2 und 3), und die nachfolgenden Trp-Biosynthesegene werden exprimiert. Unter diesen Bedingungen entsteht nur das Leaderpeptid (unten rechts).

Regulatorische RNAs in Bakterien sind wichtig für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Weit verbreitet sind *cis*-aktive RNA-Elemente wie Riboswitches, RNA-Thermosensoren und Ribosom-abhängige Attenuatoren, welche die Expression der stromabwärts liegenden Gene durch sich gegenseitig ausschließende Strukturen im mRNA-Leader beeinflussen. Des Weiteren können vom komplementären DNA-Strang transkribierte „echte“ Antisense-RNAs in *cis* auf die Genexpression wirken. Andere Riboregulatoren wie kleine RNAs (sRNAs) regulieren dagegen in *trans*, indem sie entweder Proteine binden oder eine imperfekte Basenpaarung über relativ kurze Abschnitte mit der Ziel-mRNA eingehen und dadurch ihre Translation und/oder Stabilität beeinflussen können [1]. Manche dieser regulatorischen RNAs codieren zusätzlich funktionelle kleine Proteine [2].

### Transkriptionsattenuatoren als Quellen für kleine RNAs und Proteine

Einer der am besten verstandenen RNA-Mechanismen in *cis* ist die Transkriptionsattenuation des Tryptophan-Biosyntheseoperons *trpEGDCFBA* in *Escherichia coli* [3]. Wenn die Konzentration von Tryptophan (Trp) in der Zelle niedrig genug ist, um die Repression des *trp*-Operons aufzuheben, bestimmt die Geschwindigkeit der Translation des kleinen *trpL*-ORFs im RNA-Leader, ob die Transkription der *trp*-Strukturgene stattfindet (Abb. 1). Das *trpL*-ORF beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Trp-Codone. Ist ausreichend geladene  $tRNA^{Trp}$  vorhanden, wird *trpL* schnell translatiert. Das bewirkt die Ausbildung eines Rho-unabhängigen Terminators in der entstehenden RNA, und die Transkription wird vorzeitig abgebrochen. Unter zellulärem Trp-Mangel und entsprechend niedrigen  $tRNA^{Trp}$ -Mengen verweilt das Ribosom länger an den Trp-Codonen in *trpL*. Auf RNA-Ebene führt das zur Ausbildung eines Antiterminators, und die *trp*-Gene werden transkribiert. Der Transkriptionsrepressor beeinflusst die Expression des *trp*-



**▲ Abb. 2:** Funktionen der Attenuator-sRNA rnrTrpL. **A**, In *Sinorhizobium meliloti* werden bei Trp-Überschuss die Operons *trpE(G)* und *ppiD-trpDC-moaC-moeA* nicht reprimiert, sondern auf RNA-Ebene reguliert. Die durch Attenuation des *trpE(G)*-Operons entstandene rnrTrpL-sRNA bindet an *trpD* in der polycistronischen *ppiD-trpDC-moaC-moeA*-mRNA und destabilisiert diese. Dieselbe RNA wirkt also regulatorisch in *cis* und in *trans*. **B**, In *Escherichia coli* wird das *trp*-Operon bei Trp-Überschuss reprimiert. Eine Transkription findet erst bei Nahrungsmangel statt, wobei die Expression der *trp*-Gene für Trp-Biosynthese sorgt und hiermit auch für die rnrTrpL-Entstehung. Die rnrTrpL-sRNA destabilisiert die *dnaA*-mRNA, die das Initiatorprotein der Replikation codiert. Dadurch trägt rnrTrpL zur Anpassung der Häufigkeit der Replikationsinitiation bei, wenn sich die Wachstumsgeschwindigkeit nahrungsbedingt unterscheidet. *OriC* und *terC* bezeichnen den Startpunkt (*origin*) und den Terminus der Replikation.

Operons etwa 100fach und der Transkriptionsattenuator etwa achtfach. Dennoch ist die Transkriptionsattenuation wichtig für Energieeinsparung, da es sich bei Trp um die Aminosäure mit den höchsten metabolischen Kosten handelt [3].

Ähnliche Attenuatoren sind in Bakterien weit verbreitet [3, 4]. Die bei der Transkriptionsattenuation entstehenden Attenuator-RNAs und Leaderpeptide wurden bisher als „Abfallprodukte“ angesehen. Sie könnten jedoch eigene Funktionen haben.

**sRNA rnrTrpL destabilisiert mRNAs**

In *Sinorhizobium meliloti*, einem im Boden lebenden stickstofffixierenden Pflanzensymbionten, liegen die Trp-Biosynthesegene in drei Operons vor, wobei nur *trpE(G)* durch Attenuation reguliert wird. Die *trpE(G)*- und *trpDC*-Operons werden bei Trp-Überschuss nicht reprimiert. Ist ausreichend Trp vorhanden, wird die *trpE(G)*-Transkription durch die Attenuation vorzeitig abgebrochen. Die dabei entstehende sRNA rnrTrpL bindet durch imperfekte Basenpaarung an *trpD* in der

polycistronischen *trpDC*-mRNA und destabilisiert sie. Bei Trp-Mangel dagegen wird der *trpL*-Leader mit *trpE(G)* ko-transkribiert; die sRNA entsteht nicht, und die *trpDC*-Gene werden effizient exprimiert. Bakterien nutzen also dieselbe RNA-Sequenz in zwei prinzipiell unterschiedlichen, posttranskriptionalen Mechanismen (Transkriptionsattenuation in *cis* und mRNA-Destabilisierung durch die sRNA in *trans*), um die Expression des *trpE(G)*- und *trpDC*-Operons zu koordinieren [5]. Dabei werden, in Abhängigkeit von der Trp-Verfügbarkeit, Gene für den Aufbau der äußeren Membran (*ppiD*) und Molybdän-Kofaktor-Biosynthesegene (*moaC* und *moeA*) gemeinsam reguliert (**Abb. 2A**).

In *E. coli* ist die sRNA rnrTrpL an der Destabilisierung der *dnaA*-mRNA beteiligt [6]. Das Gen *dnaA* codiert den Masterregulator der Initiation der Chromosomreplikation. Die enterobakterielle rnrTrpL wird im Minimalmedium oder in späteren Wachstumsphasen im reichen Medium (bei niedriger Wachstumsgeschwindigkeit) gebildet und reguliert die Initiation der Replikation herunter (**Abb. 2B**). Tryptophan hat sich also mittels des *trp*-Attenuators als Nahrungsverfügbarkeitsignal für die posttranskriptionelle Regulation etabliert.

**Peptid peTrpL reguliert ein Multiresistenzoperon**

Das Leaderpeptid peTrpL wiederum hat eine eigene Funktion in der Multiresistenz von *S. meliloti*, was für die Symbiose mit Pflanzen und für die Konkurrenzfähigkeit im Boden von Vorteil ist. In *S. meliloti* vermittelt die Effluxpumpe SmeAB die Multiresistenz. Sie entfernt antibakterielle Stoffe wie Antibiotika und Flavonoide aus der Zelle. Die Repression der *smeAB*-Gene durch das Repressorprotein SmeR wird aufgehoben, wenn die Bakterien SmeAB-Substraten wie Tetracyclin (Tc) ausgesetzt sind, wodurch es zu einer Ko-Transkription der *smeABR*-Gene kommt. Für einen erfolgreichen Efflux müssen jedoch *smeAB* hoch- und *smeR* herunterreguliert werden. Um das zu erreichen, wird deren Expression auf RNA-Ebene mithilfe des peTrpL-Peptids differenziell reguliert (**Abb. 3A**). Bei Tc-Exposition werden der Promotor des *smeABR*-Operons und ein Antisense-Promotor aktiviert. Die as-*smeR*-RNA bildet mit dem peTrpL-Peptid und Tc einen Antibiotikum-abhängigen Ribonukleoprotein-Komplex (ARNP), der eine Destabilisierung des *smeR*- und Stabilisierung des *smeAB*-Segments der mRNA bewirkt [7]. Ähnliche

Regulation greift auch bei Exposition gegenüber anderen SmeAB-Substraten, nicht aber gegenüber Kanamycin (Km), das durch SmeAB nicht gepumpt wird (**Abb. 3B**).

### Peptid reprogrammiert die sRNA bei Translationsinhibition

Das peTrpL-Peptid ist Teil weiterer ARNPs, in denen die sRNA rnTrpL mit *rplU* in der *rplUrpmA*-mRNA (codiert die ribosomalen Proteine L21 und L27) basenpaart und diese destabilisiert [8]. Diese ARNPs werden durch Inhibitoren der Translationsinitiation wie Tc und Km unterstützt, nicht aber durch den Transkriptioninhibitor Rifampicin (**Abb. 3B**). Der Zweck des *rplUrpmA*-ARNPs könnte in der vorübergehenden Herunterregulierung der Ribosombiosynthese liegen, um die zelluläre Energie vorrangig für den Antibiotikumefflux zu nutzen. Alternativ könnten Ribosomen ohne L21 und L27 entstehen, die bei der Adaptation auf Antibiotikaexposition von Bedeutung sein könnten.

Während die Interaktion der sRNA rnTrpL mit der *trpDC*-mRNA unabhängig von peTrpL und Antibiotika ist, findet die Bindung an *rplUrpmA*-mRNA nur in deren Gegenwart statt. Translationsinhibitoren und peTrpL ändern also die Substratspezifität der sRNA [8]. Dieser grundsätzlich neue Mechanismus, auf kleine Moleküle wie Antibiotika zu reagieren, sollte bei der Identifizierung von sRNA-Targets berücksichtigt werden.

### ARNP als neuer Resistenz- und Adaptationsmechanismus

Es ist überraschend, dass Produkte des *trp*-Attenuators an Resistenzmechanismen in Bodenbakterien beteiligt sind. Dies kann erklärt werden durch die oben erwähnte Trp-unabhängige Transkription vom *trpE(G)*-Promotor und die Fähigkeit des *trp*-Attenuators, auf Inhibition der Translationsinitiation durch Superattenuation zu reagieren. Hiermit ist die Translationsinhibition ein weiteres, Trp-unabhängiges Attenuationssignal zur Entstehung der sRNA rnTrpL. Die sRNA entsteht auch bei subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen, bei denen das peTrpL-Peptid weiterhin produziert wird. Dabei nimmt die Menge des Peptids mehr als 100fach zu, höchstwahrscheinlich durch eine Stabilisierung im ARNP. Bei Antibiotikaexposition sind also beide Regulatoren, rnTrpL und peTrpL, für die Destabilisierung der *rplUrpmA*-mRNA und für die differenzielle Regulation der *smeABR*-Gene verfügbar. Die Struktur der neuartigen ARNP-Komplexe unter Beteili-

gung strukturell unterschiedlicher Antibiotika muss noch aufgeklärt werden.

Der ARNP-Mechanismus erlaubt den Bakterien, die Anwesenheit von Antibiotika auf RNA-Ebene zu „spüren“ und schnell zu reagieren. Unter anfänglicher Exposition ist die Antibiotikumkonzentration in der Zelle hoch, sodass ARNPs gebildet und Ziel-mRNAs destabilisiert werden. Nach Entfernung des Antibiotikums aus der Zelle durch Efflux dissoziieren die ARNP-Komplexe, und die Genexpression wird normalisiert. Ähnliche Mechanismen wirken auch in anderen

$\alpha$ -Proteobakterien, wie dem Sojasymbionten *Bradyrhizobium japonicum* und dem Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Die Entdeckung der ARNPs in *S. meliloti* verdeutlicht die Bedeutung von Bodenbakterien als Reservoir für neue Resistenzmechanismen.

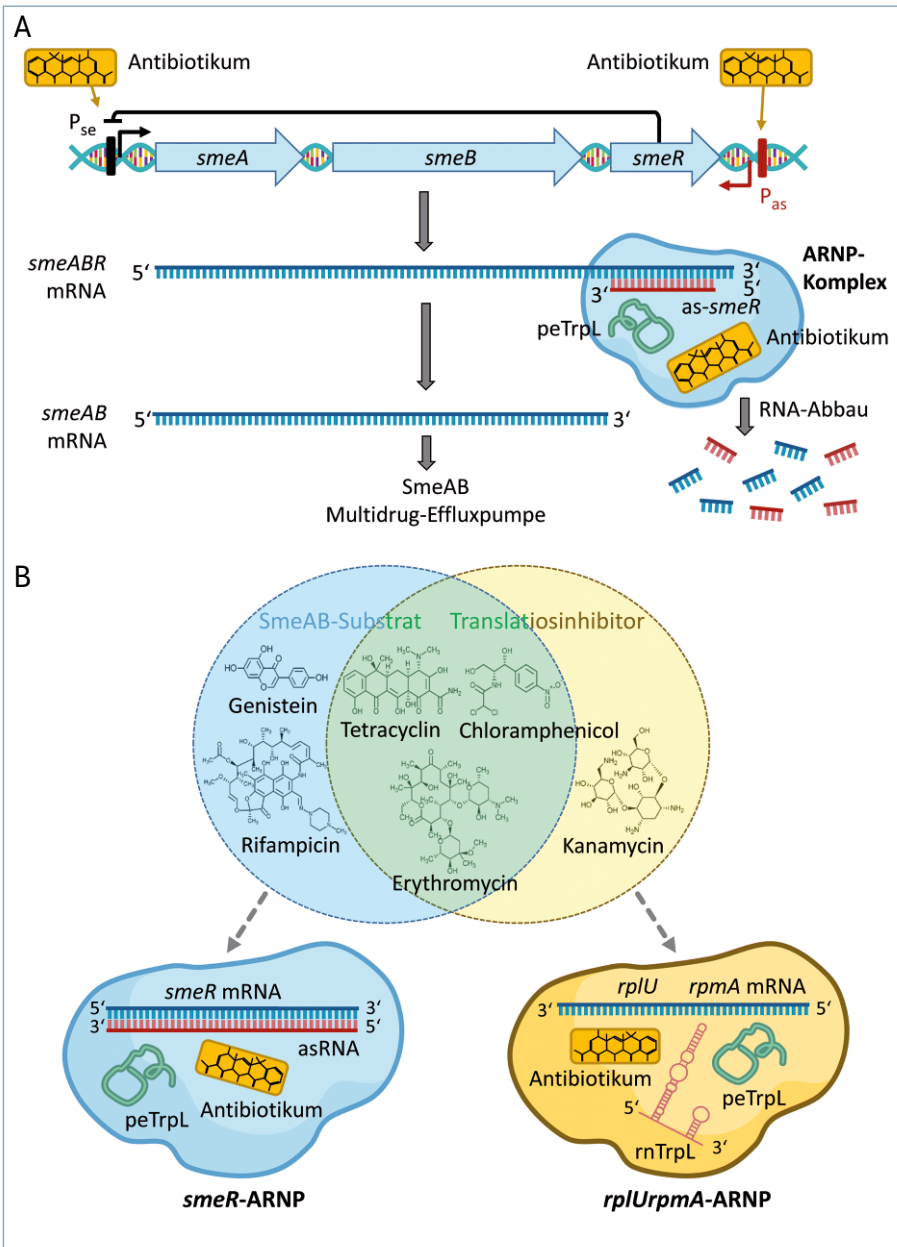
### Danksagung

Wir danken der DFG für die finanzielle Unterstützung sowie allen Mitgliedern des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre, den fruchtbaren Methodenaustausch und die anregenden Diskussionen. ■

# Hier steht eine Anzeige.



Springer



◀ **Abb. 3:** Funktionen des Leaderpeptids peTrpL in *Sinorhizobium meliloti*. **A**, Differenzielle Regulation des Multiresistenzoperons *smeABR* bei Antibiotikaexposition. Die Exposition gegenüber bestimmten Antibiotika induziert die Transkription des *smeABR*-Operons vom Sense-Promotor ( $P_{se}$ ) und der Antisense-RNA *as-smeR* vom Antisense-Promotor ( $P_{as}$ ). Die *as-smeR*-RNA, das Antibiotikum (dargestellt ist Tetracyclin) und peTrpL bilden einen ARNP-Komplex und destabilisieren das *smeR*-Segment der *smeABR*-mRNA. Dadurch wird die Expression des *smeR*-Repressorgens verhindert, und die Multidrug-Effluxpumpe SmeAB kann gebildet werden. **B**, Strukturell diverse antimikrobielle Stoffe unterstützen die Bildung von zwei unterschiedlichen peTrpL-beinhaltenen ARNPs. Das *smeR*-ARNP wird von den dargestellten SmeAB-Substraten unterstützt, die auch die Transkription von  $P_{se}$  und  $P_{as}$  (siehe A) induzieren. Die dargestellten Inhibitoren der Translationsinitiation dagegen unterstützen die Bildung von *rplUrpmA*-ARNPs unter der Beteiligung der rnrTrpL-sRNA.

plexes for posttranscriptional regulation of multiresistance genes. *mBio* 11: e01027-20  
 [8] Melior H, Li S, Stötzel M et al. (2020) Posttranscriptional regulation of ribosomal and multiresistance genes by the bacterial leader peptide peTrpL. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/606483>

**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:**

Apl. Prof. Dr. Elena Evgenieva-Hackenberg  
 Universität Gießen  
 Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie  
 Heinrich-Buff-Ring 26-32  
 D-35392 Gießen  
 Elena.Evgenieva-Hackenberg@mikro.bio.uni-giessen.de

**Literatur**

- [1] Wagner EGH, Romby P (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* 90: 133–208
- [2] Gimpel M, Brantl S (2017) Dual-function small regulatory RNAs in bacteria. *Mol Microbiol* 103: 387–397
- [3] Merino E, Jensen RA, Yanofsky C (2008) Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol* 11: 78–86
- [4] Dersch P, Khan MA, Mühlen S et al. (2017) Roles of Regulatory RNAs for Antibiotic Resistance in Bacteria and Their Potential Value as Novel Drug Targets. *Front Microbiol* 8: 803
- [5] Melior H, Li S, Madhugiri R et al. (2019) Transcription attenuation-derived small RNA rnrTrpL regulates tryptophan biosynthesis gene expression in *trans*. *Nucleic Acids Res* 47: 6396–6410
- [6] Li S, Edelmann D, Berghoff BA et al. (2020) Bioinformatic prediction reveals posttranscriptional regulation of the chromosomal replication initiator gene *dnaA* by the attenuator sRNA rnrTrpL in *Escherichia coli*. *RNA Biol* 19: 1–15
- [7] Melior H, Maaß S, Li S et al. (2020) The leader peptide peTrpL forms antibiotic-containing ribonucleoprotein com-

**AUTOREN**



**Hendrik Melior**

2011–2016 Biologiestudium an der Universität Gießen. 2016–2020 Promotion an der Universität Gießen. Seit 2020 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Universität Gießen.



**Elena Evgenieva-Hackenberg**

1984–1989 Studium der Molekularbiologie und Genetik an der Universität Prag, Tschechien. 1990–1995 Promotion an der Universität Bayreuth. Seit 1999 am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Universität Gießen. 2004 Habilitation. Seit 2016 apl. Professorin.