

## RNA-Biologie

# Den regulatorischen RNAs in *Klebsiella pneumoniae* auf der Spur

KATHRIN FRÖHLICH

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT JENA

***Klebsiella pneumoniae* is a leading cause of nosocomial infections. The spread of multidrug-resistant isolates poses a serious challenge to healthcare institutions worldwide. New systematic research into the post-transcriptional regulation of gene expression in this organism provides valuable insight into species-specific RNA-RNA networks.**

VAAM-Forschungspreis 2025

DOI: 10.1007/s12268-025-2433-9

© The Author(s) 2025

■ Weltweit sterben jährlich Millionen von Menschen an bakteriellen Infektionen. Gerade multiresistente Bakterien stellen das globale Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung, da Infektionen mit diesen Mikroorganismen nur eingeschränkt therapierbar sind und damit mit einer längeren Krankheitsdauer sowie einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden sind [1]. Für eine Gruppe von sechs bakteriellen Pathogenen mit dem Akronym ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp. – besteht aufgrund ihrer ausgeprägten Antibiotikaresistenzen und ihrer globalen Verbreitung in Einrichtungen des

Gesundheitswesens größte Dringlichkeit bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien [6].

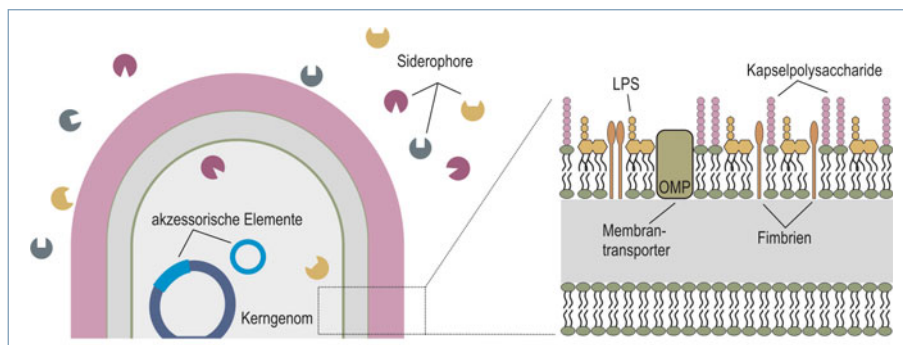
### Teil der Mikrobiota und Krankheitserreger

Das ESKAPE-Pathogen *Klebsiella pneumoniae* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges und unbewegliches Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae. *K. pneumoniae* ist häufig Teil der normalen Mikrobiota; das Bakterium kann allerdings unter bestimmten Bedingungen schwerwiegende Erkrankungen verursachen – wie Lungen- und Harnwegsentzündungen, Abszesse oder Sepsis. Klassische Isolate von *K. pneumoniae* werden mit nosokomialen, aber auch ambulant erworbenen Infektionen immungeschwäch-

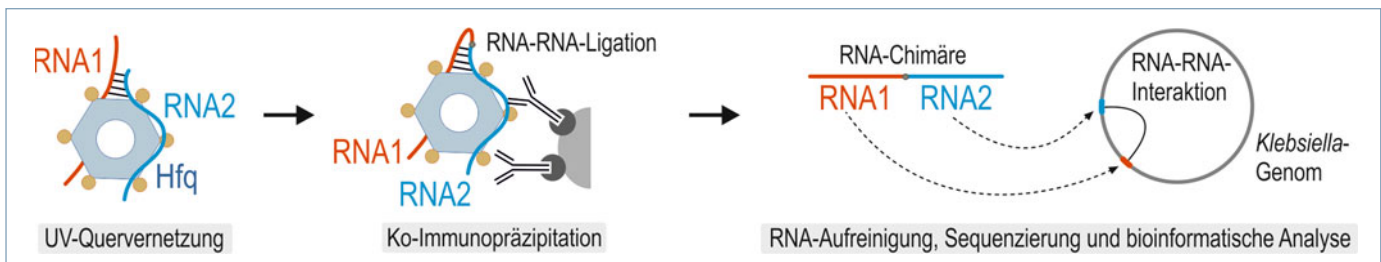
ter Patient:innen in Verbindung gebracht [5]. Die Verbreitung hypervirulenter Stämme, die auch in gesunden Personen lebensbedrohliche Krankheiten verursachen können, hat das Spektrum der betroffenen Patientengruppe jedoch erweitert.

Der Erfolg von *K. pneumoniae* als Krankheitserreger beruht eher auf wirksamen Strategien, die Abwehrmechanismen des Wirts zu umgehen als diese aktiv zu unterdrücken [7]. Als wichtigster Virulenzfaktor gilt eine dicke, in der äußeren Membran verankerte Polysaccharidkapsel. Sie schützt das Bakterium vor Phagozytose und den Komplementfaktoren des Serums, verhindert eine starke Immunantwort des Wirts und blockiert die Aktivität antimikrobieller Peptide. Das Lipopolysaccharid (LPS) unterstützt letztere Funktion der Kapsel. Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind Fimbrien, die die Adhäsion an unterschiedliche Oberflächen vermitteln, Siderophore, die die Versorgung des Bakteriums mit dem im Wirt in limitierter Menge vorhandenen Ko-Faktor Eisen sicherstellen, sowie Membrantransporter, die den selektiven Stoffaustausch ermöglichen (Abb. 1).

Während Hunderte von Genomen klinischer *K. pneumoniae*-Isolate sequenziert wurden, um für die Pathogenese einzelner Stämme relevante Marker zu bestimmen, ist über die Regulation der Genexpression in diesem Mikroorganismus deutlich weniger bekannt. Vermutlich verlaufen viele grundlegende Prozesse in ähnlicher Weise wie in den anderen, eng verwandten, aber besser untersuchten Enterobakterien *Escherichia coli* oder *Salmonella Typhimurium*. Die regulatorischen Netzwerke aber, die *K. pneumoniae* nutzt, um im Verlauf einer Infektion in spezifischen Stresssituationen zu überleben oder die Expression von Virulenzfaktoren zu optimieren, sind nur teilweise verstanden. Insbesondere die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene – also die Rolle regulatorischer RNAs – die bei anderen Bakterien als zentrale Komponente der Genexpressionskontrolle identifiziert wurde, ist bei *K. pneumoniae* noch kaum untersucht.



▲ **Abb. 1:** Sowohl auf dem *Klebsiella pneumoniae*-Kerngenom als auch auf akzessorischen Elementen sind Virulenzfaktoren codiert. Dazu zählen Siderophore, die die Versorgung des Bakteriums mit Eisen sichern sowie unterschiedliche Bestandteile der Zelloberfläche. Fimbrien dienen der Anheftung von *K. pneumoniae* an Oberflächen; Lipopolysaccharid (LPS) sowie die Polysaccharidkapsel unterdrücken Abwehrmechanismen der Wirtszelle. OMP: Outer Membrane Protein.



▲ **Abb. 2:** Experimentelle Bestimmung von RNA-RNA-Interaktomen durch RIL-seq. Basenpaarende RNAs interagieren gleichzeitig mit einem RNA-bindenden Protein wie beispielsweise Hfq und werden nach UV-Quervernetzung durch RNA-RNA-Ligation kovalent miteinander verknüpft. Die so entstandenen RNA-Chimären werden über eine Ko-Immunopräzipitation isoliert und die aufgereinigte RNA sequenziert. In der bioinformatischen Analyse nach der Sequenzierung lassen sich RNA-RNA-Interaktionen bestimmen, da die chimären Transkripte mit zwei unterschiedlichen Bereichen des Genoms assoziiert werden.

### Regulation der bakteriellen Genexpression durch sRNAs

In Bakterien werden bis zu 15 % eines Genoms in nicht proteincodierende RNAs transkribiert [9]. Neben den ribosomalen RNAs (rRNAs) und Transfer-RNAs (tRNAs) nutzt die Zelle eine Vielzahl an regulatorisch aktiven RNA-Molekülen, die auf unterschiedlichem Weg die Genexpression beeinflussen. Die heterogene Klasse kleiner RNAs (*small RNAs*; sRNAs) agiert vornehmlich über Basenpaarungen mit proteincodierenden mRNA-Molekülen, was typischerweise mit einer Veränderung der Translation, der Stabilität oder auch beider Größen im Zieltranskript einhergeht [2]. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle bindet die sRNA in einem Bereich der mRNA, der für die Translationsinitiation relevant ist. Indem die sRNA die Anlagerung der kleinen Untereinheit des Ribosoms inhibiert, wird die Translation dieser mRNA negativ reguliert. Auch eine Aktivierung der Genexpression durch sRNAs wurde in einigen Fällen nachgewiesen, beispielsweise durch die Maskierung von Erkennungssequenzen für Nukleasen oder indem die Interaktion der sRNA eine Strukturänderung des Zieltranskripts bedingt, die dessen Translation erst ermöglicht.

Die auf kurzen Basenpaarungen beruhende Aktivität der sRNAs ist in Gram-negativen Bakterien meist abhängig von RNA-bindenden Proteinen [4]. Eine zentrale Rolle nimmt das RNA-Chaperon Hfq ein, das über mehrere RNA-bindende Strukturelemente verfügt und das sowohl die Stabilität der sRNA erhöht als auch die Interaktion zwischen zwei Transkripten vermittelt. Durch die Vielzahl an Prozessen, in deren posttranskriptionelle Kontrolle Hfq involviert ist, zeigen Deletionsmutanten des Chaperons insbesondere unter Stressbedingungen oft pleiotrope Phänotypen.

### Die große Welt der kleinen RNAs in *Klebsiella pneumoniae*

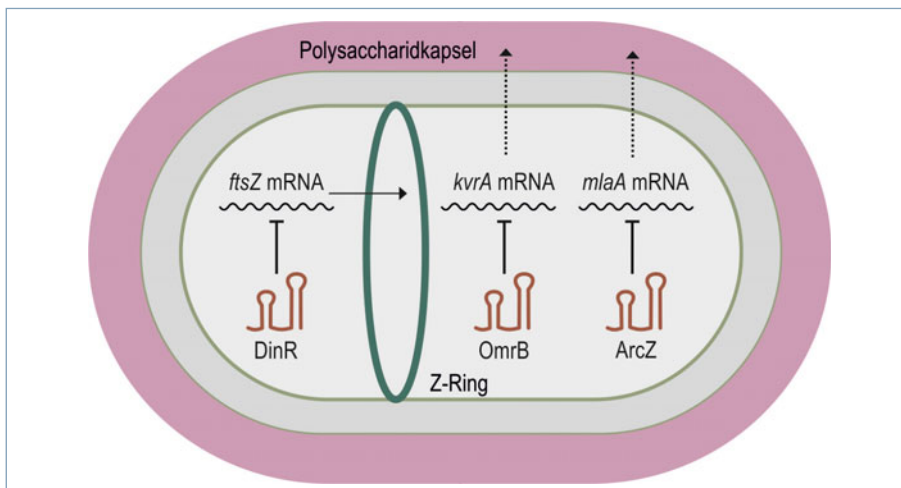
Auch in *K. pneumoniae* ist der Verlust des *hfq*-Gens mit einer eingeschränkten Stress-toleranz und einer Beeinträchtigung der Virulenz in einem Mausinfektionsmodell verbunden [1]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Hfq-vermittelten Genexpressionskontrolle eine Schlüsselrolle zukommt. Dennoch war bis vor Kurzem wenig über die stammspezifischen Liganden von Hfq in *Klebsiella* bekannt.

Drei aktuelle Studien [3, 8, 10] legen durch die Identifikation Hfq-abhängiger RNA-RNA-Interaktome einen Fokus auf die Rolle der sRNAs in *Klebsiella*. Für *K. pneumoniae* MGH 78578, einen klassischen Stamm, bestimmten wir zunächst die konservierten und stammspezifischen sRNAs [8]. Etwa 50 sRNAs ließen sich auf Basis ihrer Sequenzhomologie zu sRNAs aus *E. coli* oder *S. Typhimurium* annotieren. Diese Aufstellung ergänzten weitere sRNA-Kandidaten, die wir über die experimentelle Bestimmung der Transkriptomstartstellen sowie eine selektive Aufreinigung von Hfq-assoziiierter RNA identifizierten. Wir untersuchten die RNA-RNA-Interaktionen mit der RIL-seq-Methode (*RNA interaction by ligation and sequencing*; **Abb. 2**), bei der die Rolle von Hfq als Vermittler von RNA-Paarungen ausgenutzt wird. Werden die freien Enden zweier interagierender RNAs mittels Ligation verknüpft, entsteht ein chimäres Transkript, das gemeinsam mit dem RNA-bindenden Protein aufgereinigt wird. In der bioinformatischen Analyse nach erfolgter Sequenzierung der RNA können wir die hybriden Sequenzen zwei unterschiedlichen Positionen im Genom zuordnen. Diese Information ermöglicht eine genaue Bestimmung eines mit einem bestimmten RNA-bindenden Protein assoziierten RNA-RNA-Interaktoms. Etwa 7.000

Hfq-abhängige RNA-RNA-Paare fanden wir durch das RIL-seq-Experiment in *K. pneumoniae* MGH 78578. Wir wiesen eine Beteiligung von 74 verschiedenen sRNAs an Interaktionen nach, darunter 32 in diesem Stamm neu annotierte Regulatoren. Zu diesen zählt auch DinR, eine sRNA, die durch RNase-E-abhängige Prozessierung vom 3'-Ende der *dinI*-mRNA abgespalten wird. Die *dinI*-mRNA wird im Rahmen der Zellantwort auf DNA-Schädigung synthetisiert, und so ist auch die sRNA DinR während dieser Stressbedingung aktiv. Mithilfe des RIL-seq-Datensatzes identifizierten wir eine Interaktion zwischen DinR und der *ftsZ*-mRNA.

Das prokaryotische Tubulin-Homolog FtsZ bildet eine Ringstruktur (den Z-Ring) aus, die für die Positionierung des Septums bei der Zellteilung essenziell ist. Detektiert die Zelle jedoch Schäden am Genom, blockiert sie den Zellzyklus, um Zeit für die Reparatur der DNA zu gewinnen. Bisher war in diesem Zusammenhang für Enterobakterien ausschließlich ein Protein-vermittelter Prozess bekannt, bei dem das kleine zytosolische Protein Sula direkt an FtsZ bindet und so dessen Polymerisation unterbindet. In der Folge kommt es durch die ausbleibende Zellteilung zu einer Filamentierung der Bakterien, ein typischer Phänotyp, der bei anhaltender DNA-Schädigung zu beobachten ist. *K. pneumoniae* nutzt durch DinR eine zweite regulatorische Ebene für die Repression von FtsZ: Eine Bindung der sRNA oberhalb des Startcodons der *ftsZ*-mRNA hemmt die Translation des Proteins. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die komplementäre Aktivität von Sula und DinR die effektivste Strategie für eine Inhibierung der Zellteilung darstellt.

Neben der im Detail untersuchten DinR-sRNA beinhaltet der erstellte RIL-seq-Datensatz weitere vielversprechende Informatio-



▲ **Abb. 3:** Indem die sRNA DinR die Translation von *ftsZ* unterbindet, trägt die sRNA zu einer Blockade der Zellteilung bei. KvrA ist ein positiver Regulator der Kapselsynthese, dessen Expression von OmrB inhibiert werden kann. Indem ArcZ die Translation des für den Transport von Phospholipiden benötigten Membranproteins MlaA reprimiert, wird indirekt die Anlagerung der Kapselpolysaccharide in der äußeren Membran gestört.

nen über bisher unbekannte regulatorische Aktivitäten konservierter und *Klebsiella*-spezifischer sRNAs. So scheinen verschiedene für die Virulenz des Bakteriums relevante Faktoren, wie Fimbrien oder Siderophore, durch sRNAs ko-reguliert zu sein, und es sind Interaktionen mehrerer sRNAs mit an der Ausprägung von Antibiotikaresistenzen beteiligten Transkripten in MGH 78578 nachweisbar (**Abb. 3**).

Zwei nachfolgende Publikationen nutzten ebenfalls das RIL-seq-Protokoll bzw. eine modifizierte Variante der Methode, um die RNA-Interaktome hypervirulenter *K. pneumoniae*-Isolate zu untersuchen. In beiden Studien identifizierten die Autor:innen weitere sRNA-Kandidaten und klärten *Klebsiella*-spezifische Aktivitäten konservierter enterobakterieller sRNAs auf: OmrB, eine sRNA, die bisher in *E. coli* hauptsächlich als Regulator von Membranproteinen und Biofilmbildung bekannt war, agiert in *Klebsiella* als negativer Regulator der Synthese der Polysaccharidkapsel [3]. Auch ArcZ, eine weitere in *E. coli* und *S. Typhimurium* umfassend charakterisierte sRNA, beeinflusst den Aufbau der Kapsel [10].

Im Rahmen dieser drei Publikationen ist es gelungen, eine große Zahl an sRNAs in *K. pneumoniae* zu erfassen. Sie verdeutlichen aber auch, dass zwischen den verschiedenen *K. pneumoniae*-Isolaten nicht nur signifikante Unterschiede in der Physiologie, sondern auch im sRNA-Repertoire und den jeweiligen Interaktionspartnern bestehen. Das Kerngenom von *K. pneumoniae* wurde als die gene-

tische Information definiert, die in über 95 % aller Isolate vorhanden ist, und umfasst nur etwa 1.700 Gene [11]. Angesichts der Tatsache, dass die Genome einzelner *K. pneumoniae*-Stämme typischerweise etwa 5.000–6.000 Gene codieren, sind auch stammspezifische sRNAs in akzessorischen Elementen sowohl im Hauptchromosom als auch auf Plasmiden zu finden.

Die in den nächsten Jahrzehnten zu erwartenden Herausforderungen durch Infektionen mit multiresistenten Bakterien sind nur durch die Entwicklung neuer Strategien in der Erforschung antimikrobieller Arzneimittel zu meistern. Ausgangspunkt hierfür ist jedoch, zunächst eine grundlegende Kenntnis der Biologie der verantwortlichen Mikroorganismen zu erreichen. Durch die Erforschung der in *Klebsiella* aktiven RNA-RNA-Netzwerke wollen wir auch zukünftig dazu beitragen, dieses wichtige Pathogen zu verstehen und damit auch kontrollieren zu können.

### Danksagung

Ich bedanke mich bei meinen Mitarbeitenden für die gemeinsame Forschung. Finanziell

unterstützt wurde das Projekt durch die Friedrich-Schiller-Universität und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Exzellenzstrategie des Bundes und der Länder – EXC 2051 – Projekt-ID 390713860).

### Literatur

- [1] Antimicrobial Resistance C (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399: 629–655
- [2] Chiang MK, Lu MC, Liu LC, Lin CT, Lai YC (2011) Impact of Hfq on global gene expression and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* 6: e22248
- [3] Fröhlich KS, Papenfort K (2020) Regulation outside the box: New mechanisms for small RNAs. *Mol Microbiol* 114: 363–366
- [4] Goh KJ, Altuvia Y, Argaman L et al. (2024) RIL-seq reveals extensive involvement of small RNAs in virulence and capsule regulation in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 52: 9119–9138
- [5] Holmqvist E, Vogel J (2018) RNA-binding proteins in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 16: 601–615
- [6] Martin RM, Bachman MA (2018) Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 8: 4
- [7] Miller WR, Arias CA (2024) ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol* 22: 598–616
- [8] Paczosa MK, Mecsas J (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 629–661
- [9] Ruhland E, Siemers M, Gerst R et al. (2024) The global RNA-RNA interactome of *Klebsiella pneumoniae* unveils a small RNA regulator of cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 121: e2317322121
- [10] Westhof E (2010) The amazing world of bacterial structured RNAs. *Genome Biol* 11: 108
- [11] Wu K, Lin X, Lu Y et al. (2024) RNA interactome of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* reveals a small RNA inhibitor of capsular mucoviscosity and virulence. *Nat Commun* 15: 6946
- [12] Wyres KL, Lam MMC, Holt KE (2020) Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* 18: 344–359

**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:

Dr. Kathrin Fröhlich  
 RNA-Biologie der Bakterien  
 Institut für Mikrobiologie  
 Friedrich-Schiller-Universität Jena  
 Winzerlaer Straße 2  
 D-07745 Jena  
 Kathrin.froehlich@uni-jena.de

### AUTORIN



#### Kathrin Fröhlich

2002–2007 Bachelor- und Masterstudium der Molekularen Biotechnologie an der Universität Heidelberg. 2008–2013 Promotion am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, und der Universität Würzburg. 2013–2015 PostDoc an der Princeton University, NJ, USA. 2015–2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der LMU München. Seit 2019 Arbeitsgruppenleiterin am Institut für Mikrobiologie, Universität Jena. 2025 VAAM-Forschungspreis.