

The Role of the Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* as a Target of the Host Adaptive Immune Response: A Microbiological and Immunological Approach

Dissertation

In fulfilment of the requirements for the degree of

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences

of Kiel University

Submitted by

Verónica Chaves Vargas

Kiel, April 2025

First Examiner: Dr. Daniel Unterweger

Second Examiner: Prof. Dr. Holger Sondermann

Date of Oral Examination: June 13th, 2025

ABSTRACT

The type VI secretion system (T6SS) enables a bacterium to transport diverse effector proteins across its membranes into the extracellular space or other cells. It is found in Gram-negative bacteria of various taxa, including multiple pathogens. The functions of the T6SSs range from killing microbial competitors to manipulating eukaryotic cells and taking up nutrients. They make this nanomachine an important feature of *Pseudomonas aeruginosa*'s ability to adapt both to the environment and the human host. Despite the increasing knowledge of the molecular mechanism of T6SS-mediated protein secretion, little is known about the host's immune response to the massively secreted T6SS proteins.

In this study, we explored the interplay between the host and the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* in people with cystic fibrosis (pwCF). These individuals' lungs are chronically colonised with *P. aeruginosa* and are expected to be highly exposed to secreted T6SS proteins. We hypothesised that the individuals yield an adaptive immune response to the T6SSs of *P. aeruginosa*. To test this hypothesis, we recruited a local cohort of a hundred pwCF and established a unique collection of their biomaterials that enabled us to analyse the anti-T6SSs immune response and the T6SSs of *P. aeruginosa* of the very same individuals.

We measured the individuals' antibody response to secreted proteins of the three T6SSs, as well as to other *P. aeruginosa* proteins. We observed a stronger antibody response in pwCF compared to healthy individuals, and it was even stronger in those currently colonised with *P. aeruginosa*. With this work on a cohort of over 100 individuals and proteins of three T6SSs, we confirmed existing data on only one T6SS protein and only a few individuals and went far beyond. We discovered differences in the immune response against the three T6SSs across cohorts of two different locations and found a negative correlation to health factors such as lung function. These findings reveal a new layer of complexity regarding the role of the different T6SSs in pathogenesis.

We complemented the analysis of an individual's anti-T6SS immune response with a genotypic characterisation of the same individual's bacterial T6SSs. This analysis showed that there are no differences in the genes encoding for structural T6SS proteins between the isolates. However, there are differences between the isolates in their phylogeny. Taking this a step further, we found that individuals who are colonised with *P. aeruginosa* from phylogroup B have higher T6SS toxic effector diversity compared to pwCF colonised with isolates belonging to phylogroup A.

Overall, these findings provide unprecedented insight into the adaptive immune response to secreted proteins of the T6SS. The discovered correlation between elevated anti-T6SSs antibodies and worsening disease status gives hope for applying these findings for better diagnosis and treatment of chronic lung infections with bacterial pathogens.

ZUSSAMENFASSUNG

Das Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) ermöglicht es einem Bakterium, verschiedene Effektorproteine durch seine Membranen in den extrazellulären Raum oder in andere Zellen zu transportieren. Es kommt in gramnegativen Bakterien verschiedener Taxa vor, darunter auch in zahlreichen Krankheitserregern. Die Funktionen der T6SS reichen von der Tötung mikrobieller Konkurrenten bis zur Manipulation eukaryontischer Zellen und der Aufnahme von Nährstoffen. Sie machen diese Nanomaschine zu einem wichtigen Merkmal für die Fähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa*, sich sowohl an die Umwelt als auch an den menschlichen Wirt anzupassen. Trotz des zunehmenden Wissens über den molekularen Mechanismus der T6SS-vermittelten Proteinkontrolle ist nur wenig über die Immunantwort des Wirts auf die massiv sezernierten T6SS-Proteine bekannt.

In dieser Studie untersuchten wir das Zusammenspiel zwischen dem Wirt und dem opportunistischen Krankheitserreger *P. aeruginosa* bei Menschen mit zystischer Fibrose (pwCF). Die Lungen dieser Personen sind chronisch mit *P. aeruginosa* kolonisiert und vermutlich in hohem Maße den sezernierten T6SS-Proteinen ausgesetzt. Wir stellten die Hypothese auf, dass es eine adaptive Immunantwort dieser Personen auf die T6SS von *P. aeruginosa* gibt. Um dies zu testen, haben wir eine lokale Kohorte von hundert pwCF rekrutiert und eine einzigartige Sammlung von Biomaterialien zusammengestellt, die es uns ermöglichte, die Anti-T6SSs-Immunantwort und die T6SSs von *P. aeruginosa* bei denselben Personen zu analysieren.

Wir haben die Antikörperreaktion der Personen auf sekretierte Proteine der drei T6SS sowie auf andere *P. aeruginosa*-Proteine gemessen. Wir beobachteten eine stärkere Antikörperreaktion bei pwCF im Vergleich zu gesunden Personen, und sie war sogar noch stärker bei denjenigen, die derzeit mit *P. aeruginosa* kolonisiert sind. Mit dieser Arbeit bestätigten wir bestehende Daten zu nur einem T6SS-Protein und nur wenigen Individuen in einer viel größeren Kohorte und erweiterten die Analyse auf andere T6SS-Proteine. Wir entdeckten Unterschiede in der Immunantwort gegen die drei T6SS in zwei verschiedenen Kohorten und fanden eine negative Korrelation zu Gesundheitsfaktoren wie der Lungenfunktion. Diese Ergebnisse offenbaren eine neue Ebene der Komplexität in Bezug auf die Rolle der verschiedenen T6SS bei der Pathogenese.

Wir haben die Analyse der Anti-T6SS-Immunantwort eines Individuums durch eine genotypische Charakterisierung der bakteriellen T6SS desselben Individuums ergänzt. Diese Analyse zeigte, dass es zwischen den Isolaten keine Unterschiede bei den Genen gibt, die für strukturelle T6SS-Proteine kodieren. Allerdings gibt es Unterschiede zwischen den Isolaten in ihrer Phylogenie. In einem weiteren Schritt fanden wir heraus, dass Individuen, die mit *P. aeruginosa* der Phylogruppe B kolonisiert sind, eine höhere T6SS-Effektor-Diversität aufweisen als pwCF, die mit Isolaten der Phylogruppe A kolonisiert sind.

Insgesamt bieten diese Ergebnisse einen noch nie dagewesenen Einblick in die adaptive Immunreaktion auf sekretierte Proteine des T6SS. Die entdeckte Korrelation zwischen erhöhten Anti-T6SS-Antikörpern und einer Verschlechterung des Krankheitszustands lässt hoffen, dass diese Erkenntnisse für eine bessere Diagnose und Behandlung von chronischen Lungeninfektionen mit bakteriellen Erregern genutzt werden können.