

Natürliche Transformation

Leben und sterben lassen – horizontaler Gentransfer in *Vibrio cholerae*

MELANIE BLOKESCH

EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE LAUSANNE (EPFL), SCHWEIZ

VAAM-Forschungspreis 2015

There is a fundamental gap in our understanding of how horizontal gene transfer contributes to the enormous range of genetic variations that are observed among bacteria. Our model organism is *Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera. *V. cholerae* enters a natural competence state for the uptake of DNA in response to environmental signals. Our objective is to better understand the regulatory circuits that drive competence in this organism and the mechanistic aspects of the DNA transfer and uptake process.

DOI: 10.1007/s12268-015-0572-0

© Springer-Verlag 2015

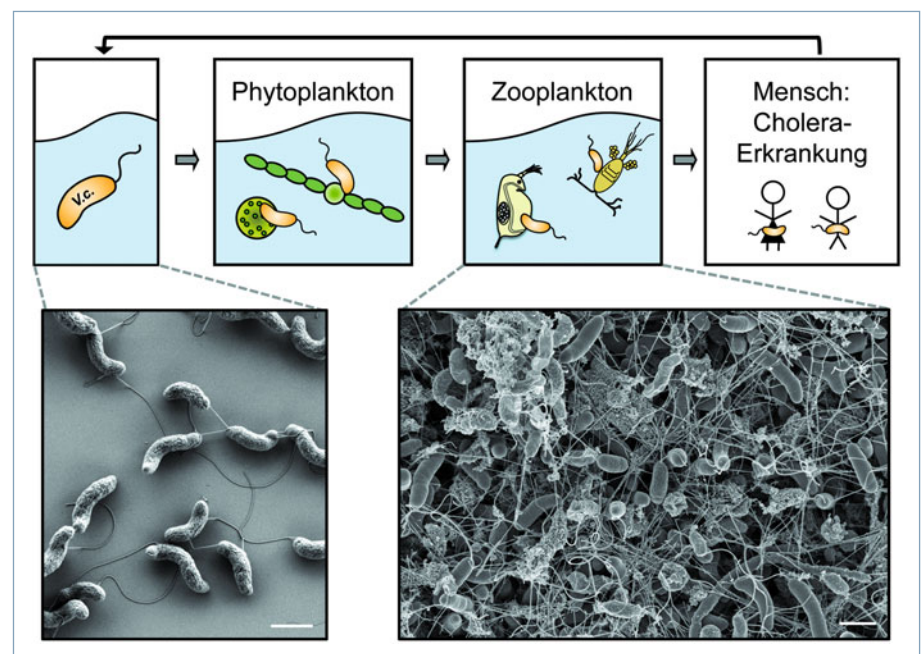
■ Cholera ist eine durch Wasser übertragene Krankheit, die durch schlechte sanitäre Bedingungen verursacht wird. Nach Infektion mit dem Erreger *Vibrio cholerae* leiden die Patienten unter starkem Durchfall. Der Verlust von Körperflüssigkeit führt zur Dehydrierung, und die Krankheit verläuft ohne Behandlung häufig tödlich.

Das Epizentrum der letzten Cholera-Pandemien ist das Flussdelta am Zusammenfluss von Ganges und Brahmaputra und dem Golf von Bengalen in Bangladesch. Hier lebt *V. cholerae* im frei schwimmenden Zustand und oftmals auch in Verbindung mit Phytoplankton und Zooplankton [1]. Es geht aus dieser aquatischen Umgebung periodisch als humanes Pathogen hervor. *V. cholerae* ist in der Lage, an kleine Crustaceen (Krebstiere) und ihre gehäuteten Exoskelette zu binden (Abb. 1). Solche Exoskelette bestehen hauptsächlich aus Chitin, einem Polymer aus N-Acetylglucosamin. Seit dem vergangenen Jahrzehnt wissen wir, dass die Verbindung zwischen dieser Mikrobe und Chitinoberflächen eine wesentliche Bedeutung für die Übertragung der Cholera-Bakterien hat. In Biofilmen auf solchen Chitinoberflächen (Abb. 1) tritt *V. cholerae* in hoher Konzentration auf. Vermutlich reicht die Aufnahme von einigen wenigen mit

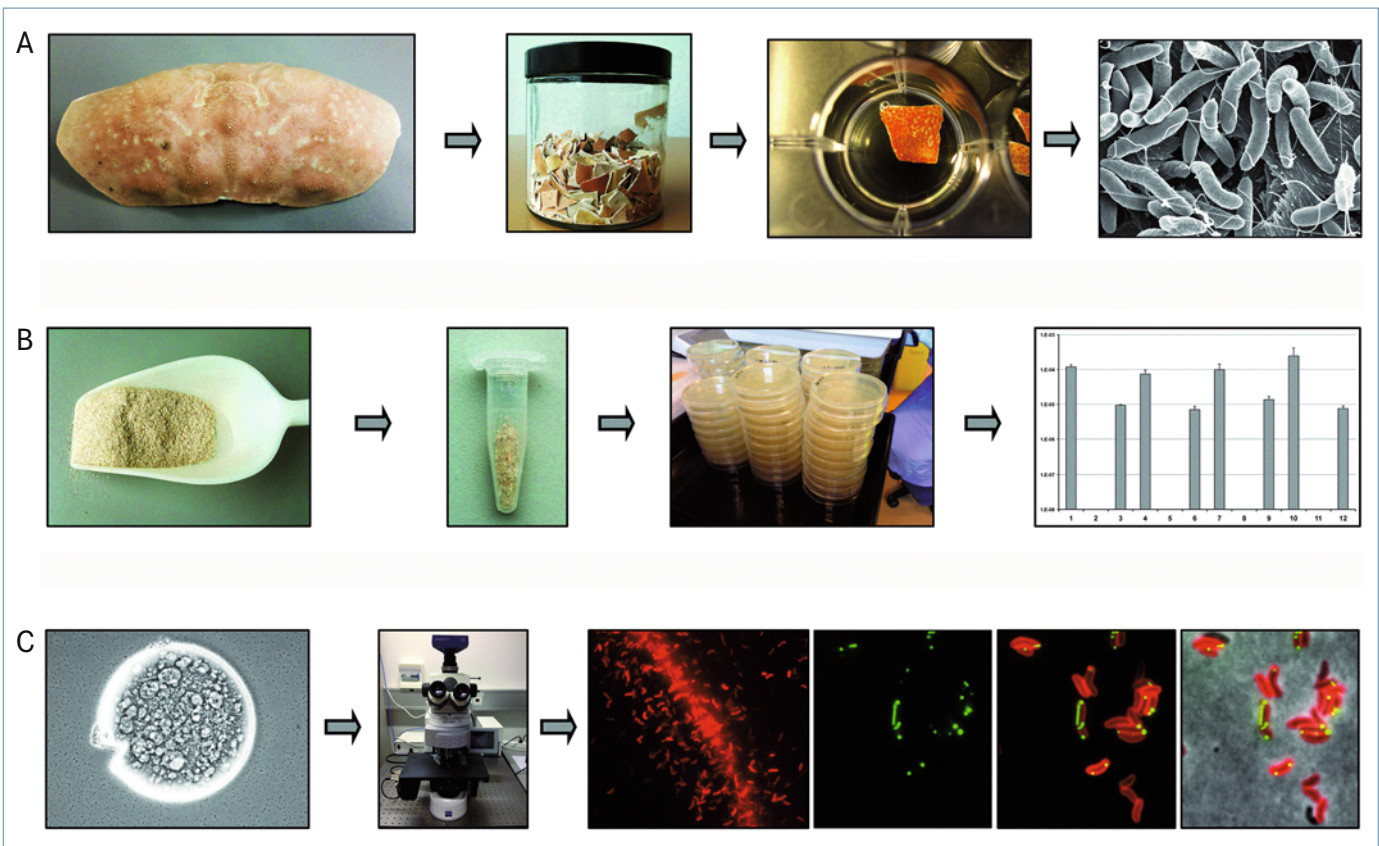
V. cholerae kolonisierten Krebstierchen aus, um die Krankheit auszulösen.

Entwicklung von *Vibrio cholerae* durch horizontalen Gentransfer

Bis vor Kurzem lag der Forschungsschwerpunkt zu *V. cholerae* auf der menschlichen Krankheit, die durch dieses Bakterium verursacht wird. Diese Einseitigkeit ist unserem Verlangen zuzuschreiben, Cholera durch die Entwicklung von Impfstoffen oder durch wirksame Antibiotika-Behandlungen zu bekämpfen. Doch für Forschungsfortschritte ist es von Bedeutung, wie und warum *V. cholerae* überhaupt pathogene Eigenschaften erlangen konnte. Insbesondere gibt die Genomsequenz von *V. cholerae* Hinweise auf eine umfangreiche Genaufnahme durch horizontalen Gentransfer (HGT). Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, durch die DNA in das Genom von *V. cholerae* gelangen kann, beispielsweise durch Phagentransduktion. Vor einigen Jahren entdeckten wir, dass Chitin die natürliche Kompetenz für



▲ **Abb. 1:** *Vibrio cholerae* in seiner natürlichen Umgebung. In aquatischen Habitaten ist *V. cholerae* als frei lebendes Bakterium (linke Rasterelektronenmikroskopieaufnahme) oder in Verbindung mit Phyto- und Zooplankton anzutreffen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt höchstwahrscheinlich durch Aufnahme kleiner (gehäuteter) Krustentierchen zusammen mit ihren opportunistischen Bakterien (z. B. als Biofilm auf Chitinoberflächen; rechtes Bild). Maßstabsbalken: 1 μm .



▲ **Abb. 2:** Kolonisierung der Chitinoberflächen durch *Vibrio cholerae* unter Laborbedingungen. Zur Untersuchung von Biofilmen kultivieren wir *V. cholerae* auf autoklavierten Fragmenten von Krabbenchalen, die anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht werden (**A**). Durch Anzucht von *V. cholerae* auf geschredderten Chitinflöcken kann die Transformationsfrequenz bestimmt werden (**B**). Chitinkugeln eignen sich für die Lichtmikroskopie und sind somit zur Visualisierung der fluoreszenzmarkierten *V. cholerae*-Zellen nützlich (**C**).

genetische Transformation in diesem Organismus induziert [2]. Natürliche Kompetenz ist ein gut bekannter HGT-Modus, der ein Bakterium in die Lage versetzt, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Dies geschieht mittels eines komplexen DNA-Aufnahmeapparates, der durch Kompetenzgene codiert wird. Die transformierende DNA kann dann über homologe Rekombination in das Empfänger-genom eingebaut werden. Mithilfe der natürlichen Kompetenz kann sich *V. cholerae* neue Gene aneignen, einschließlich solcher, die pathogene Eigenschaften definieren. Bemerkenswerterweise induzieren andere Arten der Gattung *Vibrio*, wie *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri* und *V. vulnificus*, ebenfalls ihre natürliche Kompetenz als Reaktion auf Chitin. Der von uns studierte Mechanismus scheint also von genereller Bedeutung zu sein.

Interaktion von *Vibrio cholerae* mit Chitin unter Laborbedingungen

Die Untersuchung der Interaktion von *V. cholerae* mit Chitin stellt wegen der Unlöslich-

keit des Chitinpolymers eine experimentelle Herausforderung dar. Mithilfe verschiedener Methoden konnten wir einen besseren Einblick in diese Interaktion gewinnen (**Abb. 2**). Im Labor verwenden wir für die Versuchsanordnungen das Exoskelett von Krabben. Die Krabbenpanzer werden gereinigt, in kleine Teile zerbrochen und im Autoklav sterilisiert. Anschließend wird *V. cholerae* auf diesen Oberflächen, die in ein Meerwasser-Medium eingetaucht werden, angezchtet. So können wir die Biofilme, die sich auf den Chitinoberflächen gebildet haben, mittels Rasterelektronenmikroskopie untersuchen (**Abb. 1 und 2A**). Außerdem verwenden wir handelsübliche Chitinflöcken (**Abb. 2B**). Um die bakteriellen Interaktionen mit der Chitinoberfläche und untereinander zu visualisieren, verwenden wir Chitinkugeln, da diese für die Lichtmikroskopie geeignet sind (**Abb. 2C**). Zudem ermöglicht dies die Anwendung von zellmikrobiologischen Techniken, die bessere Einblicke in den DNA-Aufnahmeprozess gewähren.

Regulationsnetzwerk: Chitin-induzierte natürliche Kompetenz und Transformation

Bisher lag der Schwerpunkt unserer Forschung auf dem Regulationsnetzwerk, das für die natürliche Kompetenz und Transformation in *V. cholerae* verantwortlich ist [3]. Weil die Chitinoberfläche als einzige Kohlenstoffquelle für *V. cholerae* dienen kann, untersuchten wir zuerst die Verbindung zwischen der Katabolitrepression und der Chitin-induzierten natürlichen Transformation. Wir konnten zeigen, dass sowohl die Kolonisierung der Chitinoberfläche als auch die Induktion der natürlichen Kompetenz Katabolit-reprimiert sind [3]. Aber „Chitin-sensing“ und Katabolitrepression waren nicht die einzigen Signale, die den Beginn der natürlichen Transformation in *V. cholerae* bestimmten; auch das Quorum sensing (QS) hatte seinen Anteil.

Mit QS messen Bakterien die Dichte von Populationen. Um eine Kommunikation zwischen Zellen zu erzielen, synthetisieren Bakterien Autoinducer(AI)-Moleküle und scheiden sie in die Umgebung ab. Andere Bakte-

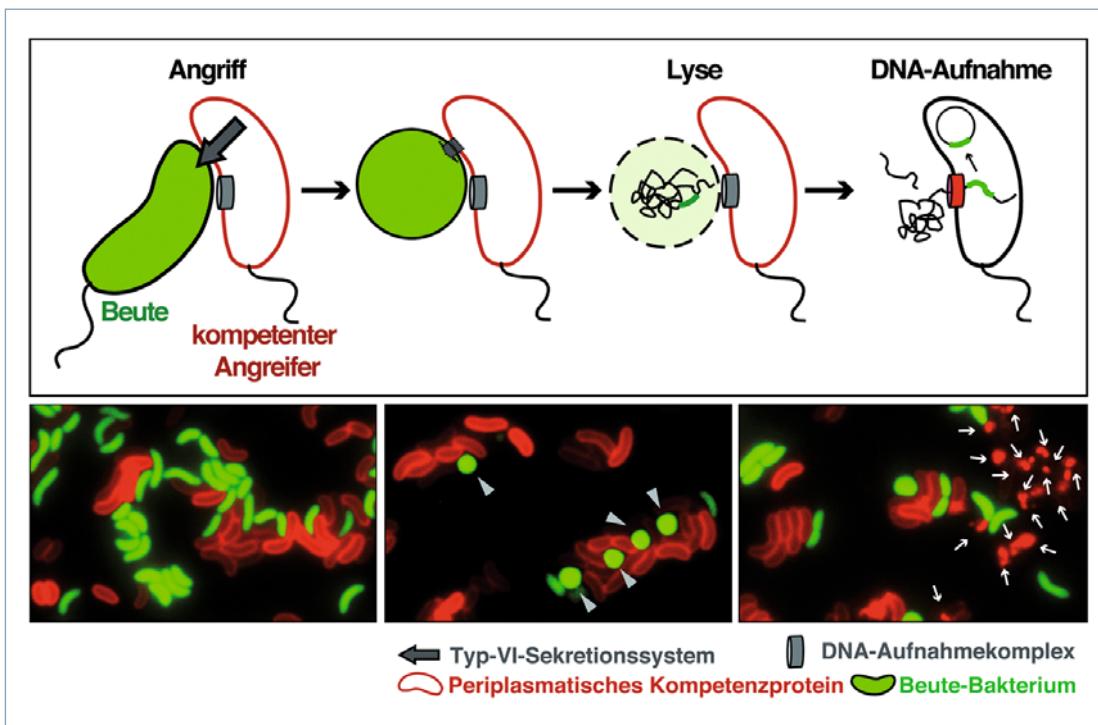
rien können derartige AI erkennen und auf diese entsprechend reagieren. *V. cholerae* besitzt zwei primäre QS-Regelkreise. Das System 1 synthetisiert und erkennt den Cholera-*Autoinducer 1* (CAI-1). Weil dieses Signal vorwiegend von *V. cholerae* produziert wird, vermutet man, dass es für die Kommunikation innerhalb der Bakterienart verantwortlich ist. Das System 2 vermittelt die Kommunikation zwischen verschiedenen Arten durch das weitläufig verwendete *Autoinducer 2*-Molekül (AI-2) [4]. Darüber hinaus ist QS für die Umstellung von DNA-Degradation in Richtung kompetenzvermittelte DNA-Aufnahme verantwortlich [5–7]. Die Chitin-induzierte natürliche Transformation hängt vom art-spezifischen CAI-1 ab, der daher als Kompetenz-Pheromon fungiert [5, 6].

Kompetenz-induzierter DNA-Aufnahmeapparat von *Vibrio cholerae*

Die DNA-Aufnahmekomplexe von natürlich kompetenten Bakterien sind noch immer nicht gut verstanden, obwohl ein makromolekularer Komplex diskutiert wird, der Typ-IV-Pilus(T4P)-ähnliche Komponenten und andere Kompetenzproteine umfasst. Viele Aspekte dieser Modelle beruhen jedoch auf korrelativen Ergebnissen (z. B. keine Pili = keine Transformation), Homologien mit dem „Standard“-T4P und experimentell nicht untermauerten Spekulationen. Wir haben kürzlich gezeigt, dass *V. cholerae* bei der Kompetenz-Induktion tatsächlich einen T4P produziert, der über die Außenmembran hinausreicht [8]. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen konnten wir auch andere Komponenten des DNA-Aufnahmekomplexes visualisieren und zeigen, dass der DNA-Aufnahmeapparat nicht strikt mit den Zellpolen assoziiert ist [8]. Das periplasmatische Kompetenzprotein ComEA sammelt sich um die eintretende DNA und kondensiert diese. Die DNA-Aufnahme über die Außenmembran wird somit höchstwahrscheinlich durch entropische Kräfte gefördert, die mit der ComEA-Bindung einhergehen [10]. Wir konnten mittels Lebendzellmikroskopie die DNA-Aufnahme in Echtzeit visualisieren [9, 10].

Töten für DNA

Unsere jüngste Studie beschreibt, wie *V. cholerae* während des Wachstums auf einer Chitin-haltigen Oberfläche sein Typ-VI-Sekretionssystem (T6SS) induziert, um Nachbarzellen zu töten (**Abb. 3**, [11]). Die T6SS-codierenden Gencluster sind Teil des Kompetenz-regulons. Mithilfe der Lebendzellmikrosko-



▲ **Abb. 3:** Kompetenz-induzierter Apparat zur Tötung von Bakterien verstärkt den horizontalen Gentransfer bei *Vibrio cholerae*. Die Kompetenz-anhängige Induktion des Typ-VI-Sekretionssystems (T6SS) fördert die natürliche Transformabilität von *V. cholerae* durch Tötung von Nachbarbakterien und Aufnahme ihrer freigesetzten DNA. Der Verlauf ist oben schematisch und unten anhand fluoreszenzmikroskopischer Bilder dargestellt (Angreifer: rot; Beute: grün; v. l. n. r.): Zusammentreffen beider Stämme, T6SS-vermittelte Zelltötung und Lyse der Beute, DNA-Aufnahme durch den Angreifer (sichtbar durch die rote Konzentration des Kompetenzproteins ComEA; weiße Pfeile).

pie haben wir gezeigt, dass *V. cholerae* bei der Kompetenz-induzierten Aktivierung des T6SS gleichzeitig kultivierte Bakterien wie *Escherichia coli* und andere *V. cholerae*-Stämme tötet und deren genetisches Material für natürliche Transformation nutzt (**Abb. 3**). Daher trägt T6SS mithilfe natürlicher Transformation zu einem verstärkten HGT bei. Dieses Ergebnis begründet eine neue Rolle des Typ-VI-Sekretionssystems in *V. cholerae*, das ursprünglich aufgrund seiner Rolle bei der Virulenz untersucht wurde [12].

Wie werden Cholera-Bakterien gefährlich?

Umweltsignale lösen die natürliche Kompetenz in *V. cholerae* aus. Unsere Studien zeigen, dass eine starke Verbindung zwischen der natürlichen Kompetenz als ein Mechanismus für HGT und der ökologischen Nische besteht, in der *V. cholerae* lebt. Deshalb vermuten wir, dass Chitinoberflächen einen *hot spot* für die natürliche Transformation darstellen und somit die Evolution von *V. cholerae* und anderen *Vibrio*-Arten fördern.

Unsere Forschungsergebnisse tragen daher zu einem besseren Verständnis der umweltbedingten Lebensweise von *V. cholerae* und

seiner Evolution bei. Zu verstehen, wie sich eine harmlose Mikrobe in der Umgebung zu einem gefährlichen humanen Pathogen entwickelt, ist für die Bekämpfung und Verhinderung schwerwiegender Cholera-Epidemien offensichtlich von großer Bedeutung.

Danksagung

Ich danke allen aktuellen und früheren Mitgliedern des Blokesch-Laboratoriums für ihre wissenschaftlichen Beiträge und Diskussionen. Hervorheben möchte ich Graham Knott von der BioEM-Einrichtung der EPFL für seine Hilfestellungen bei der Elektronenmikroskopie. Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. August Böck sowie meiner Familie für die fortdauernde Unterstützung. Die finanzielle Förderung durch die ETH Lausanne (EPFL), den Europäischen Forschungsrat (*ERC starting grant*) und den Schweizerischen Nationalfonds ist ebenfalls hoch geschätzt. ■

Literatur

- [1] Lipp EK, Huq A, Colwell RR (2002) Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol Rev* 15:757–770
 [2] Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA et al. (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310:1824–1827

- [3] Seitz P, Blokesch M (2013) Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:336–363
 [4] Ng WL, Bassler BL (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 43:197–222
 [5] Suckow G, Seitz P, Blokesch M (2011) Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner. *J Bacteriol* 193:4914–4924
 [6] Lo Scudato M, Blokesch M (2012) The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 8:e1002778
 [7] Lo Scudato M, Blokesch M (2013) A transcriptional regulator linking quorum sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. *Nucleic Acids Res* 41:3644–3658
 [8] Seitz P, Blokesch M (2013) DNA-uptake machinery of naturally competent *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:17987–17992
 [9] Seitz P, Blokesch M (2014) DNA transport across the outer and inner membranes of naturally transformable *Vibrio cholerae* is spatially but not temporally coupled. *mBio* 5:e01409–01414
 [10] Seitz P, Pezeshgi Modarres H, Borgeaud S et al. (2014) ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. *PLoS Genet* 10:e1004066

- [11] Borgeaud S, Metzger LC, Scignari T et al. (2015) The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* 347:63–67
 [12] Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ (2014) A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* 15:9–21

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Melanie Blokesch
 Laboratory of Molecular Microbiology
 Global Health Institute, School of Life Sciences
 Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (EPFL)
 Station 19, EPFL-SV-UPBLO
 CH-1015 Lausanne
 Tel.: +41-(0)21-693-0653
 melanie.blokesch@epfl.ch
 http://blokesch-lab.epfl.ch

AUTORIN



Melanie Blokesch

1995–2000 Biologiestudium an der LMU München. 2000–2004 Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. A. Böck am Department Biology I der LMU München. 2005–2009 Postdoc an der Stanford University, CA, USA. Seit 2009 Tenure-track Assistant Professor an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Lausanne (EPFL), Schweiz.