

Genominseln und horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien

Für gewöhnlich betrachtet man Chromosomen als stabile Moleküle, die für jede der neuen Tochterzellen sorgfältig kopiert werden müssen. Von wenigen Kopierfehlern – Mutationen – einmal abgesehen, geschieht mit der DNA nicht viel. Oder doch? Von bakteriellen Chromosomen ist inzwischen bekannt, dass sie so genannte «Genominseln» beherbergen, Bereiche, die sich selbst aus dem Chromosom herauschneiden können, unter bestimmten Umständen in andere Bakterienzellen gelangen und sich dort in das Chromosom des Empfängers wieder einfügen. Ihre Funktion? Sehr häufig stellen sie dem Empfängerbakterium zusätzliche Fähigkeiten zur Verfügung, um eukaryotische Wirte zu infizieren oder Verunreinigungen in der Umwelt abzubauen.

Vor fast zehn Jahren begannen wir den Vorgang des horizontalen Gentransfers bei Bakterien zu untersuchen (siehe Glossar). Unser Ziel war, herauszufinden, wie häufig bestimmte Gentypen zwischen verschiedenen Bakterien in der natürlichen Umgebung übertragen werden. Als Modell für unsere Studien wählten wir das Bakterium *Pseudomonas* sp. Stamm B13, das aus Klärschlamm isoliert wurde und 3-Chlorbenzoat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Abb. 1). Als dieser Stamm 1974 erstmals beschrieben wurde, war er einer der wenigen Bakterienstämme, die chlorierte Verbindungen abbauen konnten. Dies hatte beträchtliche Aufmerksamkeit erregt, da viele chlorierte Aromaten die natürliche Umwelt verschmutzen. Noch viel interessanter wurde der Stamm B13 allerdings wegen einer weiteren spektakulären Eigenschaft, die wir entdeckten: Diese Bakterien sind in der Lage, ihre Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat spontan auf andere Bakterienarten zu übertragen, und

das sogar im Mikrokosmos von Abwasserreinigungsreaktoren [1]. Eine der seltsamsten Entdeckungen jedoch war, dass die Rate des horizontalen Gentransfers in Anwesenheit von 3-Chlorbenzoat scheinbar anstieg. Zu diesem Zeitpunkt deuteten wir diese Ergebnisse so, dass 3-Chlorbenzoat das Wachstum jener Bakterien begünstigte, die die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat erhalten hatten. Ausserdem hatten wir nur wenig Vorstellung davon, wie diese Gene tatsächlich von B13 auf andere Stämme verteilt wurden.

Die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat liegen auf einer Genominsel

Aus diesem Grund untersuchten wir den Mechanismus für den Gentransfer genauer. Roald Ravatn, der seine Dissertation über dieses Thema schrieb, entdeckte, dass die «Empfängerbakterien» tatsächlich ein grosses DNA-Fragment mit über 100 000 Basenpaaren vom Stamm B13 erhielten. Dieses

Fragment wurde als *c/c*-Element (Abb. 2A) bezeichnet und enthält die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat [2]. Es war an ein oder zwei spezifischen Orten des Empfängerchromosoms eingebaut worden. Der Stamm B13 selbst trägt zwei Kopien des *c/c*-Elements in seinem Chromosom, die nach dem Transfer zu einem neuen Bakterium nicht verloren schienen (Abb. 2B). Roald Ravatn identifizierte auch den Faktor, der für das Herausschneiden des *c/c*-Elements und den darauf folgenden Wiedereinbau verantwortlich ist. Es handelt sich um ein als «Integrase» bezeichnetes Enzym. Der Vergleich der biochemischen Zusammensetzung der Integrase vom Stamm B13 mit anderen Proteinen ergab, dass diese zum einen mit Integrasen von bakteriellen Viren (Bakteriophagen) verwandt ist, welche ihr Genom in die Chromosomen infizierter Zellen einschleusen, und zum anderen mit Integrasen von so genannten Genominseln (siehe Glossar) [3]. Das Gen für die B13-Integrase ist am rechten Ende des *c/c*-Elements lokalisiert (Abb. 2A).

Seit einigen Jahren hat die Entdeckung weiterer Genominseln enorm zugenommen, was in erster Linie auf die zahlreichen Projekte zur Sequenzierung ganzer Genome zurückzuführen ist. Grosse Labors entschlüsselten die vollständige Nukleotidsequenz von derzeit etwa 100 bakteriellen Genomen. Durch den Einblick in die gesamte Nukleotidsequenz konnte man zeigen, dass viele Bakterien Genominseln tragen und sogar mehrere unterschiedliche Kopien besitzen. Die Genominseln zeichnen sich aus durch die Anwesenheit eines Gens für eine Integrase und einen spezifischen Ort auf dem Chromosom, an dem sie sich einfügten (Abb. 2B). Unter Zusammenfassung aller erhältlichen Informationen schlossen wir, dass auch das *c/c*-Element eine Genominsel ist.

Wann bewegt sich eine Genominsel?

Mit dem Wissen, dass die Gene für den Abbau von 3-Chlorbenzoat auf einer Ge-

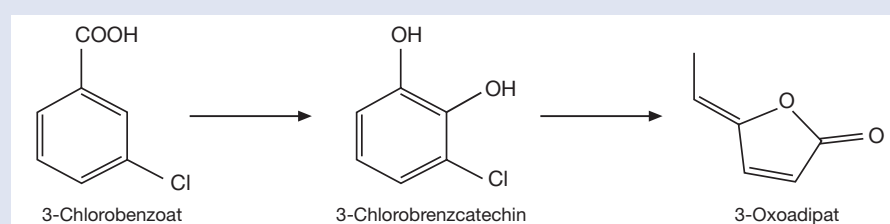


Abb. 1: Spezifischer Abbaupfad des chlorierten Aromaten 3-Chlorbenzoat. Das Produkt 3-Oxo adipat wird im allgemeinen Zellstoffwechsel weiter abgebaut.

Glossar

Genominseln

Instabile Bereiche auf Bakterienchromosomen, die sich manchmal selbst von einem Bakterium direkt in das Genom eines anderen einschleusen. Sie erhöhen die Lebensfähigkeit des Bakteriums und können in verschiedene Untertypen eingeteilt werden: z.B. «ökologische Inseln» in Umweltbakterien, «pathogenetische Inseln» in pathogenen Bakterien mit zusätzlichen Funktionen für Infektion, Toxinsynthese oder Adhäsion [4].

Grün-Fluoreszierendes-Protein oder GFP

Reporterprotein; Zellen, in denen GFP synthetisiert wird, fluoreszieren und können unter dem Epifluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Horizontaler Gentransfer

Austausch von DNA zwischen Bakterien; im Gegensatz zum vertikalen Gentransfer, der das Erben eines Gens von einem Vorfahren beschreibt. Bakterielle Reproduktion wird gewöhnlich als asexuell bezeichnet, weil Bakterien kein Äquivalent zur genetischen Verschmelzung zweier verschiedener Zellen haben, wie sie für die sexuelle Reproduktion bei Eukaryonten charakteristisch ist. Dennoch haben Bakterien die Fähigkeit, Abschnitte der DNA mit anderen Bakterien auszutauschen. Da diese Abschnitte im Genom eines Bakteriums fixiert werden und neue Eigenschaften verleihen können, könnte der Austausch von Genen zwischen Bakterien als eine Form bakterieller Sexualität betrachtet werden.

Promotor

Regulierende Region eines Gens vor der kodierenden Region. Die Aktivierung des Promotors führt zur Transkription der kodierenden Region und nachfolgend zur Synthese des entsprechenden Proteins.

nominsel liegen, wendeten wir uns erneut unserer früheren Beobachtung zu, die einen verstärkten Transfer des *clc*-Elements bei Anwesenheit von 3-Chlorobenzoat vermuten liess. Zu diesem Zeitpunkt im Jahr 1999 begann Vladimir Sentchilo seine Dissertation mit der Fragestellung, welche Faktoren in Umwelt oder Zelle den Transfer des *clc*-Elements stets die Aktivierung des Integrases vorausgeht, gingen wir von der Annahme aus, dass wir die Aktivierung des Integrases als Indikator für das darauf folgende Herausschneiden und den Transfer des *clc*-Elements ansehen konnten.

Deshalb konzentrierte sich Vladimir Sentchilo auf das Integrasesgen und entwickelte spezifische Reporterbakterien (ähnlich den Arsen-Biosensoren, siehe S. 12). Diese Reporterbakterien trugen einen molekularen Schalter, bestehend aus dem Promotor

(siehe Glossar) für das Integrasesgen, gekoppelt an das Reporterger für das Grün-Fluoreszierende-Protein (= GFP, siehe Glossar). Die Anwesenheit von GFP in der Zelle würde also anzeigen, dass der Promotor des Integrasesgen aktiviert worden war und

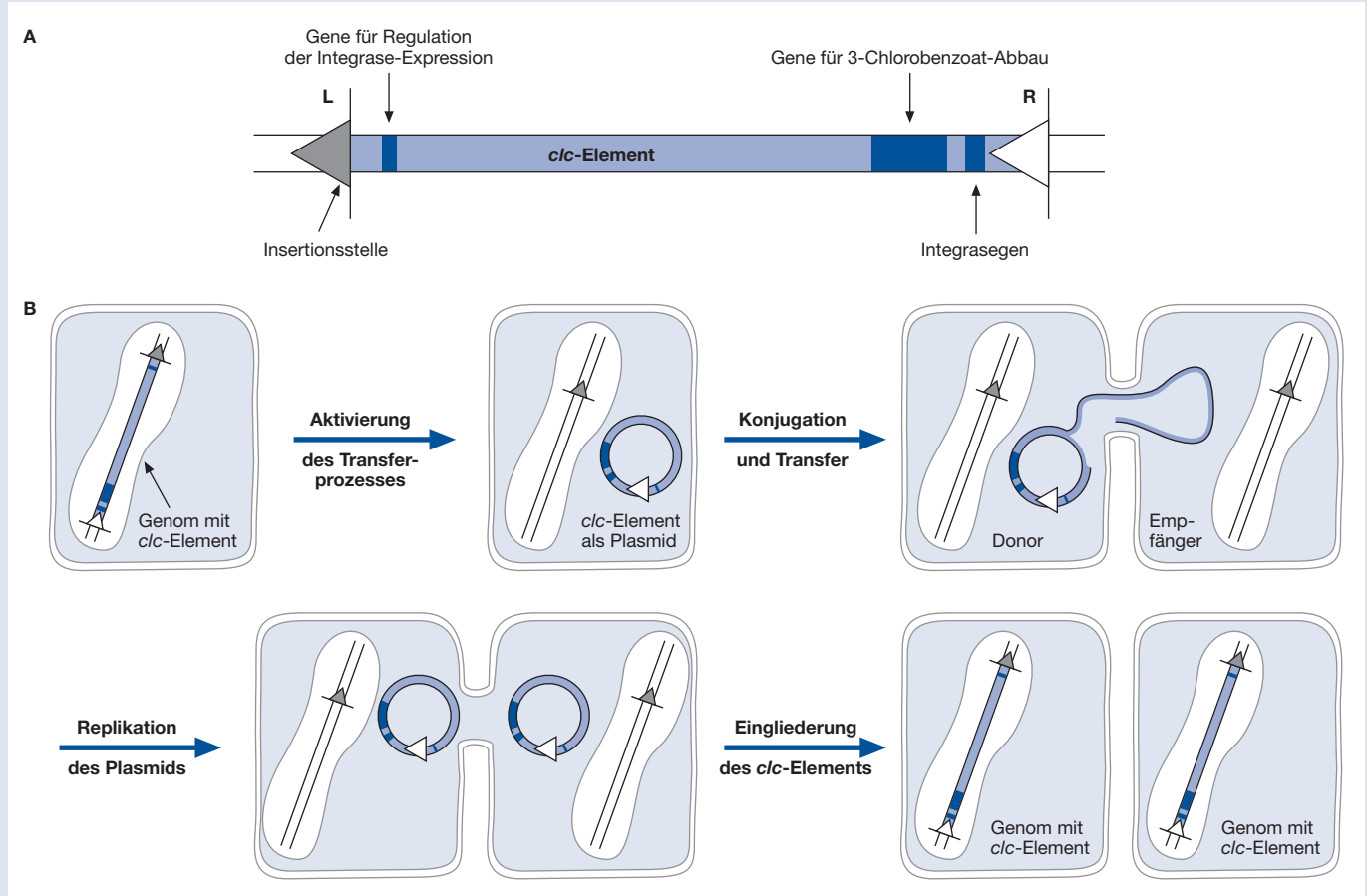


Abb. 2: Das *clc*-Element (A) und sein hypothetisches Eigenleben (B). Ist das *clc*-Element einmal aktiviert, wird es durch die Integrase aus dem Genom ausgeschnitten und liegt dann als ringförmiges DNA-Molekül (= Plasmid) in der Bakterienzelle vor. Kommt diese Zelle mit einem zweiten Bakterium ohne *clc*-Element in Kontakt, wird das *clc*-Element als Einzelstrang auf die zweite Bakterienzelle übertragen. Nach einem Replikationsschritt integriert sich das *clc*-Element an den vorbestimmten Insertionsstellen in die Genome beider Zellen. Auch beim Einbau des *clc*-Elements spielt die Integrase wieder eine ausschlaggebende Rolle.

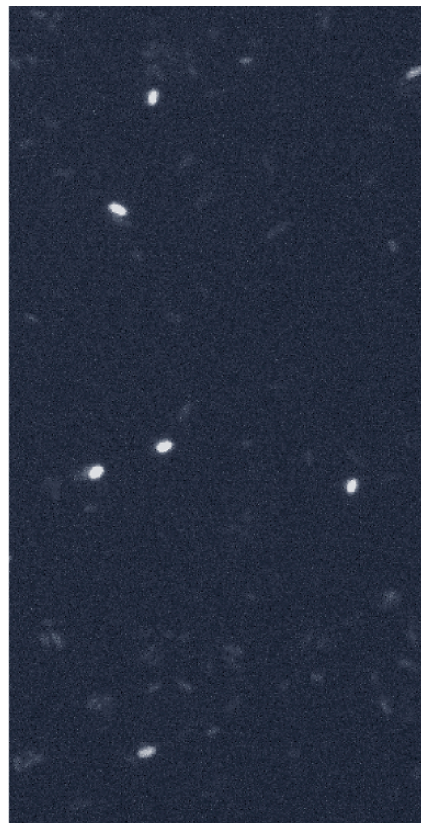
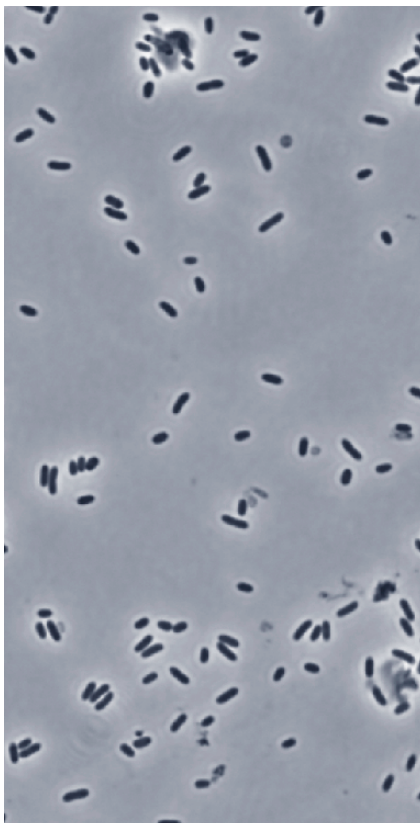


Abb. 3: Nur in wenigen Bakterienzellen einer Kultur von *Pseudomonas* sp. Stamm B13 ist der Transferprozess des *cIc*-Elements aktiviert. Vergleiche das linke Phasenkontrastbild (schwarz auf grau) mit dem gleichen Ausschnitt bei dem sich die aktivierten Bakterien als helle Zellen gegen einen schwarzen Hintergrund abheben.

dass der Transfervorgang hierauf ablaufen würde.

Zu unserem Erstaunen beobachteten wir nur sehr wenige fluoreszierende Zellen in der Kultur des transgenen Stamms B13 (Abb. 3). Dies deutete darauf hin, dass der Transfermechanismus nur in einem kleinen Teil der Population aktiviert wurde. Vor allem aber fingen die Zellen dann an zu fluoreszieren, wenn sie sich nicht mehr aktiv vermehrten, d.h. wenn die Nährstoffe knapp wurden. Wurde die Bakterienkultur allerdings mit 3-Chlorobenzoat als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt, so war die Zahl der fluoreszierenden Zellen unter Hungerbedingungen (also wenn 3-Chlorobenzoat aufgebraucht war) höher als bei der Verwendung anderer Kohlenstoffquellen. Dieses Ergebnis bekräftigte unsere Ausgangsbeobachtung und zeigte darüber hinaus, dass 3-Chlorobenzoat den Transfer des *cIc*-Elements zu einem sehr frühen Zeitpunkt – nämlich durch die Aktivierung des Integrases – stimuliert. Dagegen ist immer noch unklar, weshalb das Integrase in manchen Bakterien aktiviert wird und in anderen nicht.

Vladimir Sentchilo konnte ausserdem zwei Proteine identifizieren, die die Expression des Integrases zu beeinflussen scheinen und die vielleicht mit Signalen aus der Zelle oder der Umwelt interagieren. Interes-

santerweise liegen die Gene, die für diese beiden Proteine kodieren, auch auf dem *cIc*-Element (Abb. 2A) und ein Datenbankvergleich zeigte in einer Vielzahl anderer Bakterien ähnliche Proteine. Um die Funktion der Genominsel im Stamm B13 und ihre Evolution in Bezug zu anderen Genominseln besser zu verstehen, wird derzeit in Zusammenarbeit mit dem Institut Pasteur in Paris und dem Zentrum für Genomforschung der Universität Bielefeld, Deutschland, das gesamte *cIc*-Element sequenziert. Mit diesem Wissen hoffen wir, eine bessere Vorstellung darüber zu gewinnen, wie der Transfer des B13-Elements und anderer Genominseln reguliert wird.

Erwünschte und unerwünschte Auswirkungen

Wenn sich herausstellen sollte, dass bestimmte chemische Verbindungen in der Umwelt, wie 3-Chlorobenzoat, tatsächlich als Auslöser für einen Gentransfer agieren, könnte das weit reichenden Einfluss auf die Verteilungsraten bestimmter Genfunktionen in Bakteriengesellschaften haben. Im Hinblick auf den Abbau von Umweltgiften wäre es wohl nicht allzu problematisch, wenn die Gene für deren Abbau weiter verbreitet würden, würde das doch einen rascheren Abbau der Verschmutzungen bewirken. Dagegen dürfte es keine wirklich attraktive

Perspektive sein, pathogene Eigenschaften schneller zu verbreiten, die andere Bakterien mit zusätzlichen Fähigkeiten zur Infizierung eukaryotischer Wirte ausstatten würden. Anscheinend haben selbst die Genome jener Lebewesen, die wir gewöhnlich als die kleinsten Organismen ansehen, noch kleinere Einheiten, so etwa die Genominseln mit einem sehr merkwürdigen Eigenleben.



Jan Roelof van der Meer, Mikrobiologe und Leiter der Gruppe «Molekulare Mikrobiologie» in der Abteilung «Umweltmikrobiologie und molekulare Ökotoxikologie». Forschungsgebiete: Evolution, Abbau von Umweltgiften, Entwicklung von Biosensoren und mikrobielle Ökologie.

Koautoren: Vladimir Sentchilo, Muriel Gaillard

- [1] Ravatn R., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2126–2132.
- [2] Ravatn R., Studer S., Springael D., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (1998): Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *Journal of Bacteriology* 180, 4360–4369.
- [3] van der Meer J.R., Ravatn R., Sentchilo V. (2001): The *cIc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology* 175, 79–85.
- [4] Hacker J., Carniel E. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports* 2, 376–381.