

## Zellkern-infizierende Bakterien

# Der Eukaryoten-Zellkern als ökologische Nische für Bakterien

FRANK U. ZIELINSKI<sup>1</sup>, NICOLE DUBILIER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR UMWELTFORSCHUNG (UFZ), LEIPZIG

<sup>2</sup>MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MARINE MIKROBIOLOGIE, BREMEN

**Bakterien, die in die Zellkerne von vielzelligen Eukaryoten eindringen und diese als ihre ökologische Nische nutzen, sind weitgehend unerforscht – insbesondere in marinen Tieren. Tiefseemuschneln gewähren jetzt neue Einblicke.**

Little is known about bacteria that infect the nuclei of multicellular eukaryotes – especially in marine animals. Deep-sea mussels provide fresh insights.

*Das Leben kommt auf alle Fälle aus einer Zelle.*

*Doch manchmal endet's auch bei Strolchen in einer solchen.*

Heinz Erhardt

■ Am 10. Juli 1856 berichtete ein Herr Müller vor der Königlich Preußischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin von seinen Beobachtungen am Pantoffeltierchen *Paramecium aurelia* und erwähnte einen „Bausch von Locken gekräuselter Fäden“ in dem „Organ, welches [...] Kern genannt wird“ [1]. Diese Abhandlung gilt als die erste Beschreibung von Bakterien in eukaryotischen Zellkernen. Bis heute wurde eine Vielzahl an Bak-

terien in den Zellkernen von einzelligen Eukaryoten beschrieben, jedoch nur zwei Gattungen – *Holospora* und *Caedibacter* – wurden anhand ihrer 16S rRNA tatsächlich phylogenetisch charakterisiert [2].

Der erste Bericht über Zellkern-infizierende Bakterien bei vielzelligen Eukaryoten stammt von 1919 und steht im Zusammenhang mit der Suche nach dem Erreger des Rocky Mountain-Fleckfiebers, einer in Amerika in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts weit verbreiteten Krankheit mit hoher Sterblichkeitsrate. S. Burt Wolbach beschreibt in Zecken – den Überträgern dieser Krankheit – neben intrazellulären Stäbchen auch *intranuclear forms*, die den Zellkern häufig kom-

plett ausfüllen [3]. Dieser Erreger wird später als *Rickettsia rickettsii* identifiziert. Rickettsien sind heute eher für ihren obligat intracytoplasmatischen Lebensstil bekannt und weniger für ihre Fähigkeit Eukaryoten-Zellkerne zu besiedeln. Dennoch wurden sie seit Wolbachs Beschreibung auch in den Zellkernen von Primaten-Gewebekulturen nachgewiesen [4]. Erst kürzlich wurden Rickettsien in den Zellkernen von Bücherläusen beschrieben [5]; sie infizieren Insekten-Zellkerne wahrscheinlich häufiger als momentan bekannt ist [6]. Darüber hinaus wurden zwei nahe *Rickettsia*-Verwandte in Zellkernen dokumentiert: *Orientia tsutsugamushi* in menschlichen Leber-Epithelzellen und ein Vertreter der Gattung *Wolbachia* in einer Glasflügelzikaden-Art [7, 8]. *Rickettsia*, *Orientia* und *Wolbachia* (bei mehrzelligen Eukaryoten) sowie *Holospora* und *Caedibacter* (bei einzelligen Eukaryoten) repräsentieren eigenständige Linien innerhalb der Gruppe der *Rickettsiales* und zählen zu den Alphaproteobakterien. Zellkern-infizierende Bakterien wurden bei vielzelligen Eukaryoten bisher nur bei Tieren, nicht jedoch bei Pflanzen und Pilzen dokumentiert.

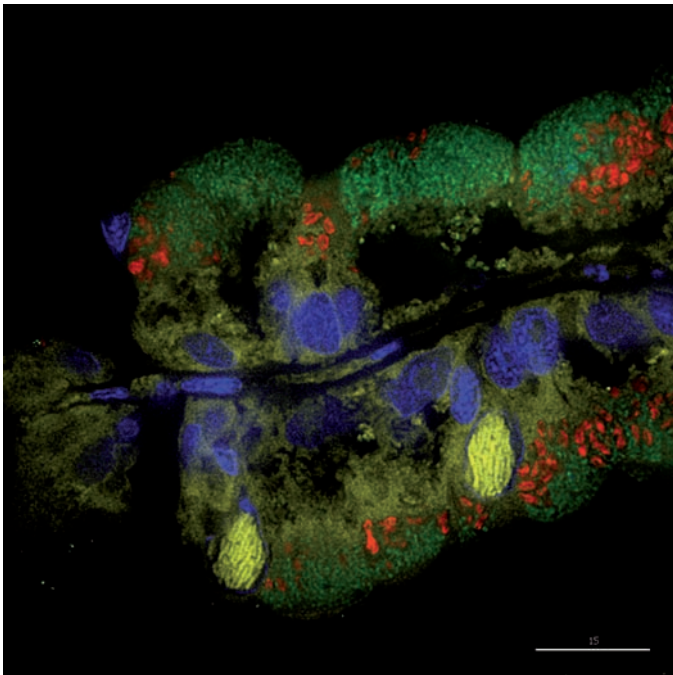
Unsere Kenntnis um Zellkern-infizierende Bakterien bei terrestrischen Tieren ist dürftig. Bei marinen Tieren beschränkt sich unser Wissen um dieses Phänomen gar auf vier Spezies – zwei Schwämme und zwei Muschneln [9–11]. Über den Infektionsverlauf oder molekulare Details ist nichts bekannt. Eher zufällig stießen wir vor Kurzem auf Zellkern-infizierende Bakterien in Tiefseemuschneln der Gattung *Bathymodiolus* und fühlten uns aufgrund der dünnen Faktenlage angespornt, etwas Licht in das Dunkel dieser weitgehend unerforschten Interaktion zwischen Bakterien und vielzelligen Eukaryoten zu bringen [12].

### Tiefseemuschneln, ihr Habitat und eine erfolgreiche Symbiose

Muschneln der Gattung *Bathymodiolus* sind nahe Verwandte der essbaren Miesmuschel (*Mytilus edulis*) und kommen an Hydrother-



◀ **Abb. 1:** Eine Ansammlung von Tiefseemuschneln der Gattung *Bathymodiolus* in 3.000 Metern Tiefe am Logatchev Hydrothermalfeld (14°45'N, Mittelatlantischer Rücken, Bild: MARUM Universität Bremen).

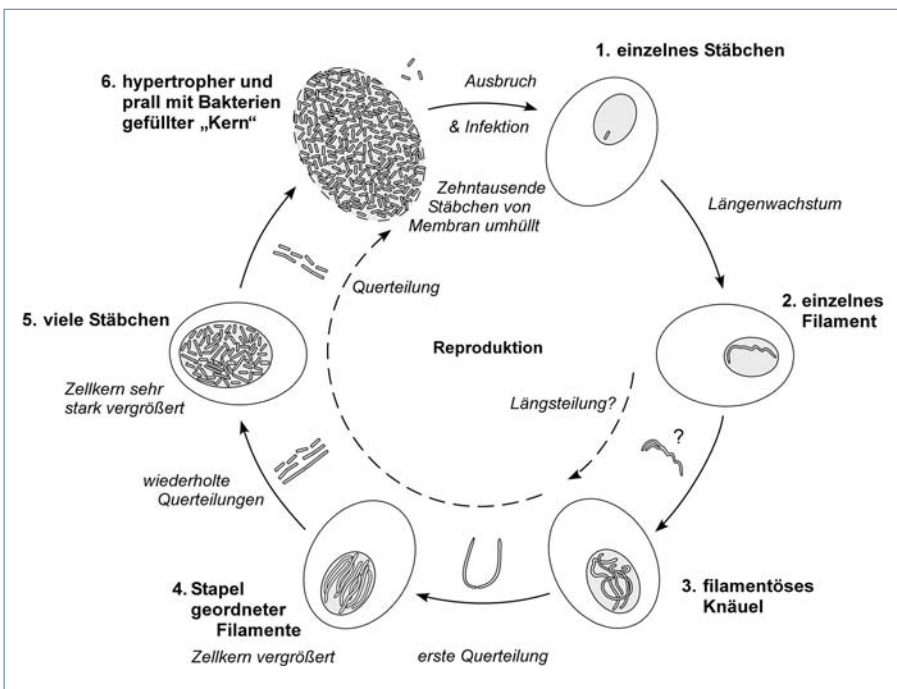


◀ **Abb. 2:** Querschnitt durch ein Kiemenfilament einer Tiefseemuschel nach Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Blau: Zellkerne; gelb: Zellkern-infizierender Parasit „*Ca. Endonucleobacter bathymodioli*“; grün: Schwefel-oxidierende Symbionten; rot: Methan-oxidierende Symbionten (beide intrazytoplasmatisch); ocker: Muschelgewebe. Der Maßstab entspricht 15  $\mu\text{m}$ .

mittels Chemosynthese in Biomasse umzuwandeln. An Hydrothermalquellen und kalten Gasaustritten bilden solche chemosynthetischen Bakterien die Grundlage der Nahrungskette, an deren Ende z. B. auch Muscheln der Gattung *Bathymodiolus* stehen. Diese Muscheln sind gar dazu übergegangen, chemosynthetische Bakterien in spezialisierten Zellen ihrer Kiemen, den Bakteriozyten, zu kultivieren. Sie leben in Symbiose mit ihren Bakterien, wobei beide Partner von dieser Beziehung profitieren. Die Muschel pumpt beständig ein Gemisch aus Sauerstoff-haltigem Meerwasser und Schwefelwasserstoff- bzw. Methan-reichen Fluiden durch ihre Kiemen und sorgt somit für die Energieversorgung ihrer Symbionten. Im Gegenzug liefern diese organische Kohlenstoffverbindungen an ihren Wirt und entgiften den ansonsten tödlichen Schwefelwasserstoff [13].

### Die Muschel und ihr Parasit – ein Storch im Zellkern und die Folgen

Bei unseren Untersuchungen an diesen Muscheln haben wir nun neben den bereits bekannten Symbionten einen Zellkern-infizierenden bakteriellen Parasiten entdeckt: „*Candidatus Endonucleobacter bathymodioli*“ [12]. Anders als die von terrestrischen Eukaryoten bekannten Zellkern-infizierenden Alphaproteobakterien gehört er phylogenetisch zu den Gammaproteobakterien. Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten wir den Parasiten in allen Muschelgeweben nachweisen, und zwar ausschließlich in den Zellkernen, niemals jedoch im Zytoplasma (**Abb. 2**). Von allen Geweben waren die Kiemen am stärksten infiziert. Zu unserer Überraschung waren aber nur die Zellkerne jener Kiemenzellen betroffen, die keine Symbionten beherbergten. Die Bakteriozyten mit den Symbionten bleiben offensichtlich von einer Infektion verschont. Die Konsequenz daraus ist: Während alle infizierten Zellen der sichere Zelltod erwartet, bleibt der Großteil der Kiemenzellen und damit die Kieme voll funktionsfähig. Das bedeutet, dass weder die Versorgung der Muschel und ihrer Symbionten mit gelösten Gasen ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$ ) noch die Kohlenhydratversorgung der Muschel durch ihre Symbionten beeinträchtigt werden und der Wirt die Infektion möglicherweise dauerhaft ohne letale Folgen tolerieren kann. In unseren fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden wir verschiedene morphologische Zustände des Parasiten, auf deren Basis wir einen Entwicklungszyklus



▲ **Abb. 3:** Entwicklungszyklus des Kern-Parasiten „*Ca. Endonucleobacter bathymodioli*“ in Zellkernen von Tiefseemuscheln auf Basis von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie. Charakteristisch sind die aufgeblähten Bakterien-gefüllten Zellkerne im letzten Stadium vor Ausbruch des Parasiten. Solche Kerne erreichen Durchmesser von bis zu 30  $\mu\text{m}$  und enthalten bis zu 80.000 Bakterien.

malquellen in der Tiefsee und an *cold seeps*, kalten Gasaustritten in der Nähe von Kontinentalrändern, vor (**Abb. 1**). Diese ansonsten sehr unterschiedlichen Habitate vereint eine Gemeinsamkeit: Aus dem Meeresboden treten Schwefelwasserstoff- und Methan-haltige Fluide aus. Schwefelwasserstoff und Methan ist

es zu verdanken, dass es in der Tiefsee in ewiger Dunkelheit überhaupt Leben gibt, denn auf dem chemischen Energiegehalt dieser reduzierten Gase basiert das gesamte Ökosystem. Schwefel- und Methan-oxidierende Bakterien nutzen diese Gase zur Energiegewinnung, um Kohlendioxid oder Methan

rekonstruieren konnten (**Abb. 3**). Die charakteristischen Stadien sind: (1) Infektion eines Zellkerns durch ein einzelnes, rund zwei Mikrometer langes stäbchenförmiges Bakterium; (2) Wachstum zu einem einzelnen, nicht septierten Filament von mindestens 20 Mikrometern Länge; (3) Ausbildung eines filamentösen Knäuels durch weiteres Längenwachstums oder aufgrund mehrfacher Längsteilungen; (4) Bildung eines geordneten Stapels von kürzeren, etwa zehn Mikrometer langen Filamenten; (5) Vervielfachung und ungeordnete Ansammlung von bis zu vier Mikrometer langen stäbchenförmigen Bakterien; (6) Ausbildung einer dicht gepackten Membran-umhüllten Ansammlung von Zehntausenden, etwa zwei Mikrometer langen stäbchenförmigen Bakterien, wobei diese Ansammlung auf ein Vielfaches der ursprünglichen Kerngröße herangewachsen ist und die einstige Zelle komplett ausfüllt. Der aufgeblähte und prall mit Bakterien gefüllte Zellkern durchbricht das Kiemenepithel, die eingeschlossenen Bakterien durchstoßen die Membran und infizieren schließlich neue Zellkerne. Der Entwicklungszyklus ist damit geschlossen. Die gesamte Entwicklung geht mit einer kontinuierlichen Vergrößerung des Zellkerns einher, ein Phänomen, das bereits von infizierten einzelligen Eukaryoten bekannt ist und als Hypertrophie beschrieben wurde [2]. Interessant ist auch, dass das Kernchromatin, also die DNA, im Zuge der bakteriellen Entwicklung zunehmend schwindet. Das deutet darauf hin, dass „*Ca. E. bathymodioli*“ die Kern-DNA möglicherweise als Nahrungsquelle nutzt. Die Reduktion von Chromatin als Folge einer Infektion mit Zellkern-Bakterien ist auch bei einzelligen Eukaryoten beschrieben worden.

### Der Zellkern als ökologische Nische – nicht auf die Tiefsee beschränkt

Die Entdeckung eines Zellkern-infizierenden bakteriellen Parasiten in Tiefseemuscheln und seine nähere Charakterisierung eröffnet der marinen Mikrobiologie ein neues Betätigungsfeld: die Erforschung von intrakompar-

timentellen Bakterien in Eukaryoten und deren Interaktionen. Zellkern-infizierende Bakterien dürften in den vielerorts Nährstofflimitierten Ozeanen weit verbreitet sein und in marinen Invertebraten eine willkommene ökologische Nische gefunden haben. Ein Vergleich der 16S-rRNA-Sequenzen von „*Ca. E. bathymodioli*“ mit den bestehenden Datenbanken lässt dies vermuten und wird durch die Existenz von Kern-infizierenden Bakterien in essbaren Muscheln aus Aquakulturen eindrucksvoll unterstützt [10–12]. Kürzlich untersuchten wir verschiedene essbare Muscheln von lokalen Anbietern in Bremen auf solche Bakterien und wurden zu unserer Überraschung erstaunlich häufig fündig. Die Tatsache, dass Zellkern-infizierende Bakterien offensichtlich auch in Flachwassermuscheln weit verbreitet sind, ermöglicht es uns, dieses Phänomen auch ohne aufwendige und kostenintensive Expeditionen in die Tiefsee näher zu untersuchen – vor Ort gewissermaßen. Immerhin, die Möglichkeit besteht, dass auch die Muscheln in Ihrer spanischen Paela nicht frei von solchen Parasiten sind.

### Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1144 „Vom Mantel zum Ozean: Energie-, Stoff- und Lebenszyklen an Spreizungsachsen“, dem DFG-Exzellenzcluster „The Ocean in the Earth System“ am Zentrum für Marine Umweltwissenschaften (MARUM) in Bremen und der Max-Planck-Gesellschaft. ■

*Ganz besonders Kriminelle agieren aus dem Kern der Zelle, nur des eigenen Vorteils wegen das System von Innen zu zerlegen.*

KonFUZius

### Literatur

- [1] Müller J (1856) Einige Beobachtungen an Infusorien. Monatsber Königl Preuß Akad Wissensch Juli:389–393
- [2] Fokin SI (2004) Bacterial endocytobionts of Ciliophora and their interactions with the host cell. Int Rev Cytol 236:181–249

- [3] Wolbach SB (1919) Studies on Rocky Mountain Spotted Fever. J Med Res 41:1–197
- [4] Ogata H, La Scola B, Audic S et al. (2006) Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. PLoS Genet 2:733–744
- [5] Perotti MA, Clarke HK, Turner BD et al. (2006) *Rickettsia* as obligate and mycetozoa bacteria. FASEB J 20:E1646–1656.
- [6] Grandi G, Guidi L, Chicca M (1997) Endonuclear bacterial symbionts in two termite species: An ultrastructural study. J Submicrosc Cytol Pathol 29:281–292.
- [7] Arneodo JD, Bressan A, Lherminier J et al. (2008) Ultrastructural detection of an unusual intranuclear bacterium in *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae). J Invertebr Pathol 97:310–313.
- [8] Pongponratn E, Maneerat Y, Chairri U et al. (1998) Electron-microscopic examination of *Rickettsia tsutsugamushi* infected human liver. Trop Med Int Health 3:242–248.
- [9] Vacelet J (1970) Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. J Microsc 9:333–346.
- [10] Elston RA (1986) An intranuclear pathogen [Nuclear Inclusion X (NIX)] associated with massive mortalities of the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. J Invertebr Pathol 47:93–104.
- [11] Azevedo C (1989) Fine structure of endonucleobiotic bacteria in the gill epithelium of *Ruditapes decussatus*. Mar Biol 100:339–341.
- [12] Zielinski FU, Perntaler A, Duperron S et al. (2009) Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodioliin mussels. Environ Microbiol 11:1150–1167.
- [13] Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. Nat Rev Microbiol 6:725–740.

### Korrespondenzadressen:

Dr. Nicole Dubilier  
Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie  
Celsiusstraße 1  
D-28359 Bremen  
Tel.: 0421-2028-932  
Fax: 0421-2028-580  
ndubilie@mpi-bremen.de  
www.mpi-bremen.de/en/Nicole\_Dubilier.html

Dr. Frank Zielinski  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)  
Department Umweltmikrobiologie  
Permoserstraße 15  
D-04318 Leipzig  
Tel.: 0341-235-1373  
Fax: 0341-235-2247  
frank.zielinski@ufz.de  
www.ufz.de/index.php?de=14582

### AUTOREN



#### Nicole Dubilier

Biologiestudium an der Universität Hamburg. 1992 Promotion. 1993–1994 Postdoc an der Harvard University (USA). Seit 2001 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen. 2002–2006 Koordinatorin der „International Max Planck Research School for Marine Microbiology“ am MPI in Bremen. Seit 2007 Leiterin der Symbiose-Gruppe am MPI in Bremen.



#### Frank Zielinski

Biologiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin. 2003–2007 Promotion in der Symbiose-Gruppe am MPI für Marine Mikrobiologie in Bremen mit zweijährigem Forschungsaufenthalt am California Institute of Technology (USA). Seit 2007 Postdoc am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig, Department Umweltmikrobiologie.