

Signalmoleküle in der Zelldifferenzierung

Zyklische Dinukleotide als molekulare Entwicklungsbremse

MIRKA E. WÖRMANN, NATALIA TSCHOWRI
INSTITUT FÜR BIOLOGIE/MIKROBIOLOGIE, HU BERLIN

***Streptomyces* are renowned producers of antibiotics and other medically useful molecules. They undergo a developmental life cycle involving progression from vegetative growth to the erection of reproductive aerial hyphae, which differentiate into chains of spores. The second messengers c-di-GMP and c-di-AMP control this complex morphological transition. Studies on signalling mechanisms in this bacterial model led to the discovery of a tetrameric c-di-GMP, a sigma factor as an unexpected type of c-di-GMP effectors and a new class of c-di-AMP phosphodiesterases.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1430-2
© Die Autorinnen 2020

■ Zurecht wurde das Multitalent *Streptomyces* zur Mikrobe des Jahres 2016 gekürt [1]. Als mikrobielle Fabriken von Wirkstoffen produzieren Streptomyceten viele lebensrettende Antibiotika. Durch Sekretion von Exoenzymen leisten diese Bodenbewohner einen wichtigen Beitrag zu Stoffumsätzen im

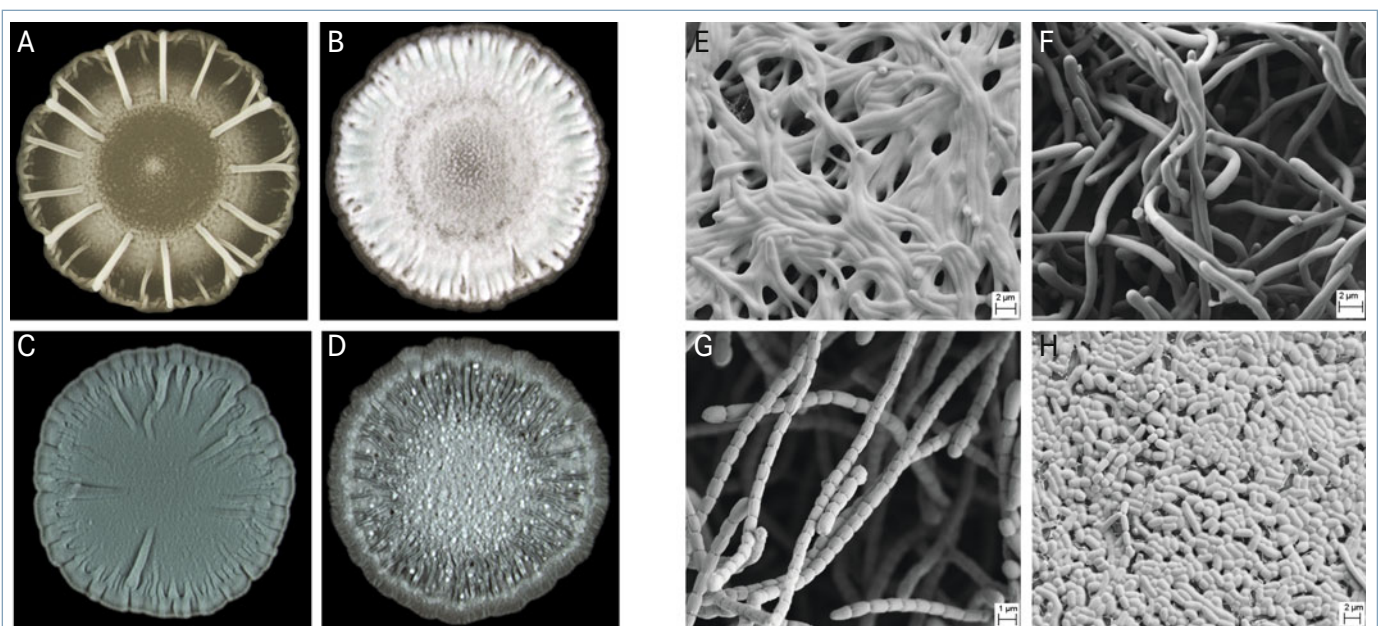
Erdboden und sorgen so für den Erhalt des ökologischen Stoffkreislaufs. Sie synthetisieren das flüchtige Terpenoid Geosmin und erweitern so unsere Duftpalette um die feine Note „Waldgeruch“. Die Strategie hinter der Produktion von Geosmin trägt zur geografischen Verbreitung der Bakterien bei. Streptomyceten sind unbeweglich und locken mit Geosmin Arthropoden – etwa

Springschwänze – an, denen sie als Nahrung dienen und über deren Exkremente sie in neue Habitate gelangen [2].

Lebenszyklus der Streptomyceten

Als wahre Formwandler faszinieren Streptomyceten durch ihre morphologische Plastizität. Sie durchlaufen einen Lebenszyklus, in dessen Verlauf sie drei verschiedene Existenzformen annehmen. Unter guten Wachstumsbedingungen existieren sie vegetativ als Substratmyzel aus hydrophilen Hyphen. Die vegetativen Hyphen sind mehrzellig und bestehen aus vielen durch Querwände getrennten Einzelzellen, die mehrere Kopien des Erbguts enthalten. Sie vermehren sich durch Wachstum an der Hyphenspitze und durch die Ausprägung von Verzweigungen. Die Bakterien erscheinen in dieser Wachstumsphase als glatte, glänzende und farblose Kolonien (**Abb. 1A, E**).

Unter widrigen Umweltbedingungen leiten Streptomyceten die Bildung von Überdauerungsformen – den Sporen – ein. Der erste



▲ **Abb. 1:** Morphologie von *Streptomyces venezuelae*. Links: Kolonien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. A, vegetativ. B, Luftmyzel. C, sporulierend. D, hypersporulierend. Rechts: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. venezuelae* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. E, vegetative Hyphen. F, Lufthyphen. G, sporulierende Hyphen. H, Hypersporulierer.

Schritt auf diesem Weg ist die Ausscheidung hydrophober Proteine, die die Hyphen ummanteln und die der Brechung der Oberflächenspannung beim Übergang in die Luftphase dienen. Die Mehrzelligkeit wird jetzt aufgegeben und es entsteht das Luftmyzel. Anders als die vegetativen Hyphen sind Lufthyphen unverzweigt und bestehen nur aus einer Zelle, die aber bis zu 100 Kopien des Erbguts enthalten kann. Mit der Bildung des Luftmyzels verändert sich auch das Aussehen der *Streptomyces*-Kolonie – sie erscheint jetzt haarig und weiß (**Abb. 1B, F**).

Schließlich wird die Metamorphose vollendet. Entlang der Längsachse der Lufthyphen entstehen in regelmäßigen Abständen Zellwände. In jeder der so entstehenden Kammern befindet sich exakt eine Kopie des Erbguts. Die Kompartimente reifen zu widerstandsfähigen Sporen heran, die wie eine Perlenkette lose aneinanderhängen (**Abb. 1C, G**). Vom Winde verweht, vom Wasser davon gespült oder durch Insekten verschleppt verbreiten sie sich. Fällt eine Spore auf fruchtbaren Boden, kann der *Streptomyces*-Lebenszyklus neu beginnen [3].

Den Kreis durchbrechen: Streptomyceten auf Abwegen

Die Chronologie der Entwicklungsstadien im *Streptomyces*-Lebenszyklus galt lange Zeit als festgelegt. Seit kurzem wissen wir, dass es durchaus Abweichungen von der Norm gibt. Ausgelöst werden diese Abwege durch Signalmoleküle, wie beispielsweise Trimethylamin. Nimmt z. B. *Streptomyces venezuelae* diese Substanz wahr, wird das Bakterium zum Entdecker: Es entstehen „Explorierzellen“, die den vegetativen Hyphen zwar ähneln, jedoch anders als diese keine Verzweigungen bilden. Dies beschleunigt die Ausbreitung auf unglaubliche ca. 90 $\mu\text{m}/\text{h}$ und erlaubt die Eroberung neuer Lebensräume unter Umgehung der aufwendigen Sporenbildung [4].

Während der explorative Lebensstil durch die filamentöse Morphologie dominiert wird, können durch den sekundären Botenstoff bis-(3',5')-zyklisches-di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) vermittelte Signale in *S. venezuelae* Hypersporulation auslösen (**Abb. 1D, H**). Dabei verkürzt sich der Lebenszyklus, indem die Ausbildung der Lufthyphen ausbleibt und die Sporen verfrüht aus den vegetativen Hyphen gebildet werden. Die Erforschung dieses ungewöhnlichen Phänotyps führte zur Aufdeckung der zentralen Rolle von c-di-GMP in der Regulation des *Streptomyces*-Lebenszyklus [5].

Doppelt hält besser: c-di-GMP blockiert die Sporulation auf zweierlei Weise

Die Synthese von c-di-GMP aus zwei GTP-Molekülen katalysieren Diguanylatzyklasen (DGCs), während die Hydrolyse Phosphodiesterasen (PDEs) übernehmen. *Streptomyces*-Stämme besitzen durchschnittlich zehn Enzyme, die den intrazellulären Spiegel von c-di-GMP kontrollieren – ein unscheinbares Set, wenn man bedenkt, dass die meisten Bakterien mehrere Dutzend solcher Enzyme haben (z. B. 53 bei *Vibrio cholerae*). Dass c-di-GMP eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der *Streptomyces*-Differenzierung spielt, war demnach eine eher überraschende Erkenntnis.

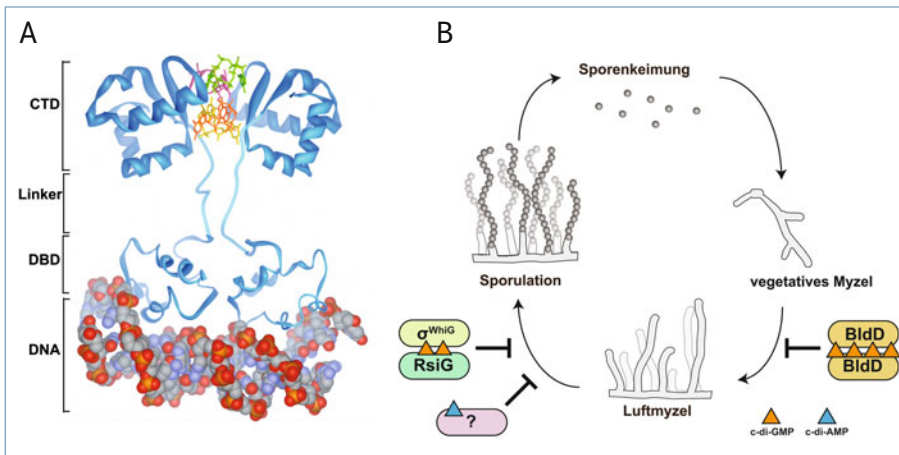
Ein komplexes Netzwerk aus Regulatoren kontrolliert die zeitlich feinjustierte Abfolge der Entwicklungsereignisse des *Streptomyces*-Lebenszyklus. An der Spitze dieses Netzwerks sitzt ein hoch konservierter Masterregulator BldD. Dieses Protein besteht aus einer DNA-bindenden Domäne am N-Terminus und einer c-di-GMP-bindenden C-terminalen Domäne (CTD). Im Komplex mit c-di-GMP dimerisiert BldD und bindet in dieser Konformation an die Ziel-DNA. Die Aufklärung der Struktur offenbarte eine molekulare Besonderheit: BldD bindet ein c-di-GMP-Tetramer – bislang das einzige Beispiel in der Biologie. Auch der Dimerisierungsmechanismus ist ungewöhnlich, denn im BldD₂-(c-di-GMP)₄-Komplex gibt es zwischen den BldD-CTDs keine Protein-Protein-Kontakte, und c-di-GMP wirkt wie ein Klebstoff, der die zwei CTD-Monomere zusammenhält (**Abb. 2A**, [5]).

Die Mengen von BldD sind in der vegetativen Wachstumsphase der Streptomyceten besonders hoch. In dieser Phase ist auch der c-di-GMP Spiegel erhöht. Da BldD primär als Repressor agiert und viele Sporulationsgene kontrolliert, führt das Zusammenspiel der beiden Faktoren dazu, dass die Initiation der Sporulation, d. h. die Ausbildung der Lufthyphen, blockiert wird (**Abb. 2B**).

Ein c-di-GMP-vermittelter Bremsmechanismus der Sporulation ist jedoch offensichtlich nicht genug, denn ein hoher c-di-GMP-Spiegel blockiert auch die Transformation der Lufthyphen in Sporenketten. Auch hierbei haben Streptomyceten c-di-GMP für einen bislang einzigartigen Mechanismus eingespannt, in dem ein Sigma- und ein Anti-Sigmafaktor zum Einsatz kommen. Sigmafaktoren sind Unter-einheiten der RNA-Polymerase, die spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich erkennen und daran binden. Anti-Sigmafaktoren wechselwirken mit Sigmafaktoren und halten

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ Abb. 2: Der Lebenszyklus von *Streptomyces*. **A**, Struktur des BldD₂-(c-di-GMP)₄-DNA-Komplexes. CTD: Carboxyterminale Domäne; DBD: DNA-bindende Domäne. **B**, Der Lebenszyklus beginnt mit der Keimung einer Spore. Durch apikales Wachstum und Verzweigungen des Keimlings entsteht das vegetative Myzel. Stresssignale lösen die Ausbildung des Luftmyzels aus. Aus den Luftmyzhen werden Sporenketten gebildet, die schließlich zerfallen. c-di-GMP aktiviert BldD zur Repression der Luftmyzelausbildung und inhibiert Sporulation durch Stabilisation des σ^{WhiG} -RsiG-Komplexes. c-di-AMP verzögert die Sporulation mittels eines bislang unbekanntem Effektors.

diese inaktiv. Zusammen mit c-di-GMP bindet der Anti-Sigmafaktor RsiG an den Sporulations-Sigmafaktor σ^{WhiG} , sodass dieser nicht mehr für die RNA-Polymerase zur Verfügung steht. Folglich werden wichtige Sporulationsgene nicht abgelesen und es kommt zur Blockade der Sporulation (**Abb. 2B**, [6]).

Mit der Aktivierung des Sporulationsrepressors BldD und der Hemmung des Sporulationsaktivators σ^{WhiG} bewirken hohe c-di-GMP-Mengen auf unterschiedliche Weise eine Blockade des Differenzierungsprogramms. Wie genau diese Entwicklungsbremsen schließlich gelöst werden und welche spezifischen Signale c-di-GMP vermittelt, bleibt allerdings noch aufzuklären.

Zwei Moleküle, ein Ziel: Auch c-di-AMP verzögert die Entwicklung

c-di-AMP wird von Enzymen mit einer Diadenylyltransferase (DAC)-Domäne aus ATP synthetisiert und stellt einen wichtigen Regulator des Ionenhaushalts sowie osmotischen Ausgleichs in vielen Bakterien dar. Zum Abbruch der c-di-AMP-vermittelten Signale wird das Molekül durch PDEs gespalten. Diese sind entweder durch eine HD- oder durch eine DHH-DHHA1-Domäne ausgezeichnet.

Obwohl alle Aktinobakterien, zu denen auch *Streptomyces* gehören, c-di-AMP produzieren, sind bei ihnen (ausgenommen Mykobakterien) die bekannten PDEs nicht vertreten. Kürzlich identifizierten wir das AtaC-Protein als eine neuartige c-di-AMP-PDE in *S. venezuelae* [7]. AtaC ist in Aktinobakterien

weit verbreitet und spaltet c-di-AMP zu zwei Molekülen AMP. Eine Deletion von *ataC* oder Inaktivierung des Enzyms führt zur Anreicherung von c-di-AMP und hat eine starke Verzögerung der Sporenbildung zur Folge. Wie c-di-AMP-Signale in die regulatorische Kaskade der Differenzierung eingespeist werden, erforschen wir derzeit. Spannend wäre es, wenn der involvierte Mechanismus eine molekulare Schnittstelle zwischen c-di-AMP- und c-di-GMP-Signalen beinhaltet.

Danksagung

Wir bedanken uns bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihr Engagement bei der Umsetzung der hier vorgestellten wissenschaftlichen Projekte. Kim C. Findlay danken

wir für die Aufnahmen in Abb. 1E–H und Jürgen Lassak für den Blick eines Außenbetrachters auf diesen Artikel. Die Forschung im Labor von Natalia Tschowri wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Emmy-Noether-Programm und Schwerpunktprogramm SPP 1879) gefördert. ■

Literatur

- [1] Schrepf H, Keller U (2016) Streptomyceten – relevant für Ökologie, Medizin und Biotechnologie. *BIOSpektrum* 1:22–25
- [2] Becher PG, Verschut V, Bibb MJ et al. (2020) Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nat Microbiol* 5:821–829
- [3] Bush MJ, Tschowri N, Schlimpert S et al. (2015) c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. *Nat Rev Microbiol* 13:749–760
- [4] Jones SE, Ho L, Rees CA et al. (2017) *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *Elife* 6:e21738
- [5] Tschowri N, Schumacher MA, Schlimpert S et al. (2014) Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell* 158:1136–1147
- [6] Gallagher KA, Schumacher MA, Bush MJ et al. (2020) c-di-GMP Arms an Anti-sigma to Control Progression of Multicellular Differentiation in *Streptomyces*. *Mol Cell* 77:586–599
- [7] Latoscha A, Drexler DJ, Al-Bassam MM et al. (2020) c-di-AMP hydrolysis by the phosphodiesterase AtaC promotes differentiation of multicellular bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:7392–7400

Funding Open Access funding provided 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. Natalia Tschowri
Institut für Biologie/Mikrobiologie
Humboldt-Universität zu Berlin
Philippstraße 13
D-10115 Berlin
natalia.tschowri@hu-berlin.de

AUTORINNEN



Mirka Wörmann

2001–2007 Biologiestudium an der Universität Münster. 2007–2011 Promotion am Imperial College London, UK. 2011–2015 Postdoc-Aufenthalt an der Oxford Universität, UK und 2016–2017 am Robert-Koch-Institut in Wernigerode. Seit 2018 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der HU Berlin.



Natalia Tschowri

2001–2012 Biologiestudium und Promotion an der FU Berlin. 2012–2013 Postdoc-Aufenthalt am John Innes Centre, Norwich, UK und 2013–2016 an der HU Berlin. 2016–2020 Emmy-Noether-Gruppenleiterin an der HU Berlin. Seit 2020 Professur an der Universität Hannover.