

Streptococcus mutans

Quorum Sensing und Karies

HELENA SZTAJER, ANDRÉ LEMME, IRENE WAGNER-DÖBLER
AG MIKROBIELLE KOMMUNIKATION, HELMHOLZ-ZENTRUM FÜR INFektions-
FORSCHUNG, BRAUNSCHWEIG

Das bakterielle Signalmolekül Autoinducer-2 (AI-2) spielt für die Entwicklung von Biofilmen eine wichtige Rolle. Wie kann *Streptococcus mutans*, ein an der Kariesentstehung beteiligtes humanes Pathogen, AI-2 detektieren und darauf reagieren?

The bacterial signaling molecule autoinducer-2 (AI-2) plays an important role in the development of biofilms. How is *Streptococcus mutans*, a human pathogen involved in caries, able to detect AI-2 and react to it?

■ Quorum Sensing bezeichnet die Fähigkeit von Bakterien, in Abhängigkeit von der Konzentration von Signalmolekülen – den Autoinduktoren – ihren Phänotyp zu verändern. Typischerweise wird diese Veränderung durch Transkriptionsregulatoren in der Zelle (LuxR-Proteine) gesteuert, die als molekulare Schalter fungieren und in Abhängigkeit von der Konzentration an Signalmolekülen zwei unterschiedliche Konformationen anneh-

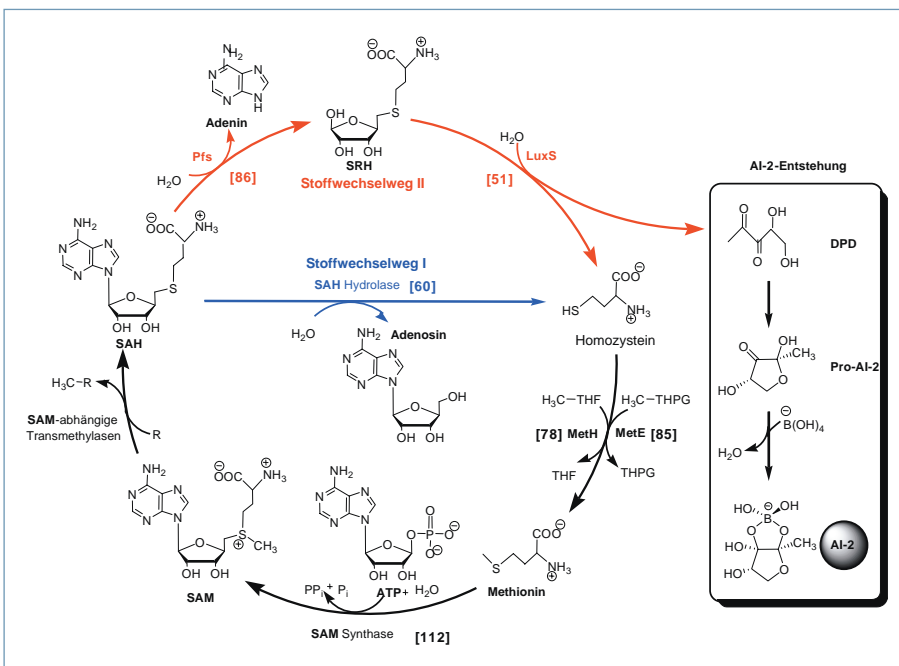
men können. Die Interaktion zwischen Signalmolekül und Rezeptor ist hochgradig stammesspezifisch. Das Ergebnis ist die Synchronisation der Genexpression der gesamten Population sowie eine fein abgestimmte Anpassung an das Habitat, beispielsweise den eukaryotischen Wirt. Da die Konzentration an Autoinduktoren nicht nur von der Zelldichte abhängt, sondern *in situ* sehr stark auch von den Diffusionseigenschaften in der

Umgebung der Zelle (Diffusion Sensing), wurde kürzlich als übergeordnetes Konzept der Begriff des Efficiency Sensing vorgeschlagen^[1].

In diesem Kontext nimmt das bakterielle Signalmolekül Autoinducer-2 (AI-2) eine Sonderrolle ein. Es wird nicht von einer spezialisierten Synthese hergestellt, sondern ist das Nebenprodukt der Regeneration von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), dem zentralen Methylendonator in der Zelle^[2]. Das betreffende Enzym, S-Ribosyl-L-Homocysteinase, abgekürzt LuxS, bildet eine Vorstufe von AI-2, und zwar 4,5-Dihydroxy-2,3-Pentandion (DPD) (Abb. 1). In wässriger Lösung entstehen aus DPD spontan zwei zyklische Enantiomere, von denen eines Borat komplexiert und das andere nicht. Beide werden derzeit kollektiv als AI-2 bezeichnet, da sie über die zyklische Form im chemischen Gleichgewicht miteinander stehen, jedoch gibt es für jedes Enantiomer einen spezifischen Rezeptor bei Bakterien^[3].

Eine Besonderheit von AI-2 liegt in der Art der Synthese (Abb. 1). Ein und dasselbe Molekül wird von Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria und Firmicutes hergestellt (aber nicht von Alphaproteobacteria und Actinobacteria)^[4, 5] – es ist also kein universelles, aber ein weit verbreitetes bakterielles Signal. In Archaea und Eukarya kommt es nicht vor. Die Synthese von AI-2 wird nicht durch positive Rückkopplung autoinduziert. In *Streptococcus mutans* und einigen anderen Bakterien ist die Expressionsrate von *luxS* während der gesamten Wachstumsphase konstant^[6]. Heterolog produziertes AI-2 kann in einer Transposonmutante von *Vibrio harveyi* Lumineszenz induzieren; dieser Bioassay ist zurzeit die gängige Nachweismethode für AI-2^[7]. Geht man davon aus, dass AI-2 nicht zur Zelldichte-abhängigen Synchronisation der Genexpression der Population verwendet wird, sondern über die Bakterien in der unmittelbaren Nachbarschaft der Bakterienzelle informiert, dann ist die eigentlich spannende Frage die Zellantwort auf heterolog produziertes AI-2.

Dieser Frage sind wir bei *Streptococcus mutans* nachgegangen. Dieses Bakterium gehört zu den ersten Besiedlern der Zahnoberfläche und bildet mit hunderten von anderen Arten den Plaque genannten Biofilm.



▲ **Abb. 1:** Entgiftung von SAM und Synthese von AI-2 im aktivierten Methylzyklus. SAM, S-Adenosyl-Methionin; SAH, S-Adenosyl-Homocystein; SRH, S-Ribosyl-Homocystein; DPD, 4,5-Dihydroxy-2,3-Pentandion; Pro-AI-2, Vorstufe von AI-2; AI-2, Autoinducer-2. Die Zahlen in Klammern zeigen die Anzahl analysierter Genome, in denen das Enzym gefunden wurde (reziproker bester Treffer). Modifiziert nach [4].

Die hohe Zelldichte und Nachbarschaft im Plaque sind ideale Voraussetzungen für einen intensiven Austausch von Signalmolekülen^[8]. Viele Bakterien der Mundhöhle sind in der Lage, AI-2 zu synthetisieren; demnach liegt dort heterolog produziertes AI-2 vor. *S. mutans* ist signifikant mit der Entstehung von Karies assoziiert, bedingt durch seine Fähigkeit zur Biofilmbildung und Säureproduktion sowie seine Säuretoleranz. *S. mutans* besitzt zwei Quorum Sensing-Systeme, zum einen das stammspezifische *Competence Stimulating Peptide* (CSP), durch das Kompetenz, Produktion von Bacteriozinen und Biofilmentwicklung reguliert werden^[9], zum anderen das *luxS*-Gen und damit die Fähigkeit zur Produktion von AI-2.

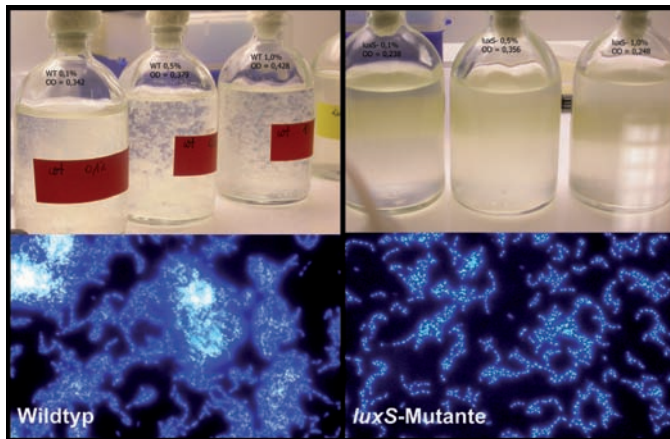
Hier liegt die andere Besonderheit von AI-2. Üblicherweise findet man das Quorum Sensing-Regulon, indem man Synthese oder Detektion des Signalmoleküls ausschaltet. Es gab in den letzten Jahren viele Publikationen über *luxS*-Mutanten, die sehr unterschiedliche Beobachtungen zeigten, von „kein Phänotyp“ bis zu Veränderungen der Biofilmbildung und Virulenz. Der veränderte Phänotyp einer *luxS*-Mutante kann jedoch auch auf dem defekten Methyl- und Schwefelstoffwechsel beruhen und muss nicht automatisch eine Reaktion auf das fehlende Signalmolekül AI-2 sein. Durch eine Komplementation der *luxS*-Mutante mit chemisch reinem Autoinducer kann man jedoch Signalwirkung und Stoffwechseldefekt voneinander trennen.

Mikroarray-Experiment

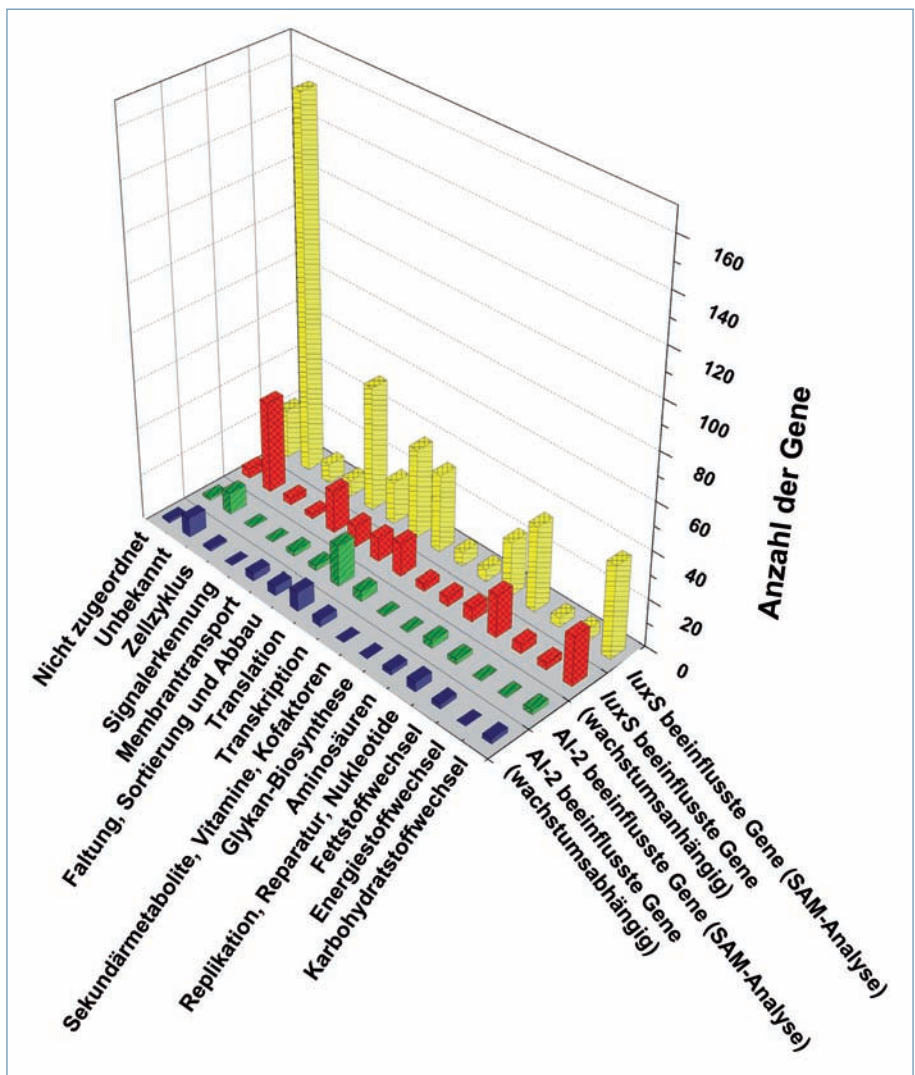
Bei *luxS*-Mutanten von *S. mutans* wurden veränderte Biofilmbildung, reduzierte Säuretoleranz, erhöhte Resistenz gegen H₂O₂ und eine veränderte Bacteriozin-Produktion beschrieben. In Flüssigkultur wächst die *luxS*-Mutante homogen, während der Wildtyp klumpt und ausfällt (Abb. 2). Um die molekularen Schalter für die Reaktion auf AI-2 zu finden, haben wir einer Kultur der *luxS*-Mutante von *S. mutans* chemisch synthetisiertes AI-2 zugegeben. Das Transkriptom wurde während des Wachstums zu mehreren Zeitpunkten mit demjenigen von Wildtyp und nicht komplementierter *luxS*-Mutante verglichen. Hierzu wurde ein Genom-Array verwendet, auf den 50-mer-Oligonukleotide für die 1.952 Gene von *S. mutans* gespottet waren (methodische Einzelheiten in [6]).

luxS-abhängige Gene in S. mutans

Als *luxS*-abhängige Gene bezeichnen wir Gene, deren Expression in der *luxS*-Mutan-



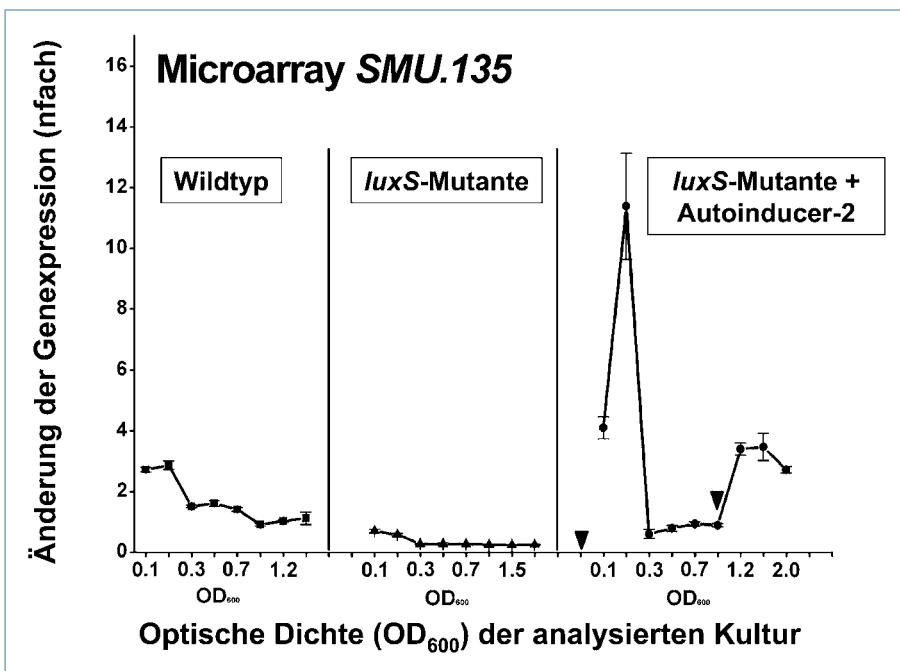
▲ **Abb. 2:** Phänotyp der *luxS*-Mutante von *Streptococcus mutans* UA159. Während der Wildtyp in Flüssigkultur Flocken bildet, wächst die *luxS*-Mutante relativ homogen und zeigt zwar die typischen Ketten, aber keine Flockenbildung (oben: Kulturflasche; unten: DAPI-Färbung).



▲ **Abb. 3:** Überblick über die Auswirkung der *luxS*-Mutation auf das Transkriptom von *S. mutans*. Differenziell exprimierte Gene sind nach funktionellen Kategorien zusammengefasst. „*luxS* beeinflusste Gene“: Gene, deren Expression durch AI-2 nicht beeinflusst wurde; „AI-2 beeinflusste Gene“: Gene deren Expression durch AI-2 wieder hergestellt wurde. Die Daten wurden jeweils auf zwei verschiedene Arten ausgewertet: 1. SAM (Significance Analysis of Microarrays) und 2. Wachstumsabhängige Analyse (Expression im Vergleich zum Zeitpunkt t = 0). Modifiziert nach [6].

te signifikant verändert war und sich durch Zugabe von AI-2 nicht beeinflussen ließ. Die *luxS*-Mutation erwies sich als extrem pleio-

trop. Bei einem Mindestwert von 2,0fach waren 585 Gene differenziell exprimiert, das entspricht etwa 30 Prozent des gesamten



▲ **Abb. 4:** Microarray-Analyse der Expression des Gens *SMU.135* während des Wachstums von *S. mutans*. Gezeigt werden die Ergebnisse für die Kultur des Wildtyps, der *luxS*-Mutante, sowie der *luxS*-Mutante supplementiert mit synthetischem Signalmolekül AI-2. Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe von AI-2. Modifiziert nach [6].

Genoms. Bei anderen *luxS*-Mutaten wurden vergleichbare Werte gefunden, z. B. 404 Gene bei *Escherichia coli*, und das bei einem deutlich höheren Mindestwert der differentiellen Genexpression von 5,0fach^[10]. **Abbildung 3** zeigt, dass alle funktionellen Kategorien betroffen waren, insbesondere Membrantransport, Translation, Transkription, DNA-Replikation und Kohlehydrat-Stoffwechsel. Betroffen waren auch Gene, die mit für *luxS*-Mutanten beschriebenen Phänotypen in Zusammenhang stehen, beispielsweise *comC* (Kompetenz), *aguA* (Säuretoleranz), Bacteriozin-Produktion und Biofilmbildung.

AI-2-abhängige Gene in *S. mutans*

Es sind solche Gene gemeint, deren Expression sich bei Zugabe von AI-2 signifikant im Vergleich zur *luxS*-Mutante veränderte. Insgesamt wurden 59 Gene gefunden, etwa zehn Prozent der durch die *luxS*-Mutation betroffenen Gene. Die meisten dieser Gene wurden hochreguliert, ein Teil jedoch herunterreguliert, das heißt AI-2 konnte die Regulation in beide Richtungen steuern. Ein erheblicher Teil der AI-2-abhängigen Gene stand in Zusammenhang mit Proteinsynthese, DNA-Synthese und Stressreaktionen. Als interessante Targets für weitere Analysen wurden globale und lokale Regulatoren der Genexpression sowie Transportproteine gefunden.

RpoE: Das am stärksten differenziell exprimierte Gen der gesamten Analyse war *SMU.96*, das für die Delta-Untereinheit der RNA-Polymerase codiert (RpoE) und 147fach durch AI-2 stimuliert wurde. RpoE ist in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet und kommt in Gram-negativen nicht vor. Es wird vermutet, dass RpoE zusammen mit dem Sigmafaktor σ^A die gleiche Funktion hat wie σ^{70} in *E. coli*. RpoE scheint die Spezifität der RNA-Polymerase zu modulieren. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass *rpoE* dichteabhängig exprimiert wird. RpoE ist daher ein globaler Modulator der Genexpression, dessen starke Induktion durch AI-2 ein möglicher Mechanismus für die Steuerung vielfältiger Gene durch AI-2 sein könnte.

SMU.135: Während des Wachstums der Kultur wurde AI-2 zu Beginn und bei einer $OD_{600} = 0,9$ zugegeben. In beiden Fällen stieg die Expression von *SMU.135* signifikant an, was darauf hinweist, dass *SMU.135* positiv autoreguliert ist und AI-2 als Ligand fungiert (**Abb. 4**).

SMU.135 codiert für einen Transkriptionsregulator vom LysR-Typ. Diese Regulatoren besitzen ein DNA-Bindungsmotiv und eine Bindungsdomäne für ein Effektormolekül am C-Terminus. Als mögliche Liganden kommen Zucker, Aminosäuren und anorganische Ionen in Frage. AI-2 hat eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu Ribose.

SMU.1168: Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der TetR-Repressoren. Durch Zugabe von AI-2 wurde die Transkription von *SMU.1168* 3,4fach induziert.

SMU.408: Die Expression dieser Permease war in *luxS*-Mutanten bis zu 3,7fach reduziert, bei Zugabe von AI-2 bis zu 7,3fach induziert. *SMU.408* gehört in die Familie von MSF (*Major Facilitator Superfamily*)-Transportern, deren Substratspektrum Aminosäuren, Nukleotide und Zucker umfasst. *SMU.408* besitzt keine Ähnlichkeit zu den anderen AI-2-bindenden oder -transportierenden Proteinen.

SMU.1667: Hierbei handelt es sich um eine Permease (*livM*), die Teil eines Transportkomplexes für verzweigte Aminosäuren ist.

Kommunikation in der Mundhöhle

AI-2, das weit verbreitete bakterielle Signalmolekül, stellt einen neuen Typ der Zell-Zell-Kommunikation dar. AI-2 informiert die Zelle über die Stoffwechselaktivität der umgebenden bakteriellen Gemeinschaften. Es liefert nur ungefähre Informationen über deren Dichte und phylogenetische Zusammensetzung.

In den letzten Jahren wurden viele *luxS*-abhängige Phänotypen entdeckt. Dennoch steht die Aufklärung der tatsächlich vom bakteriellen Signalmolekül AI-2 gesteuerten Eigenschaften erst am Anfang, ebenso wie die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Detektion von AI-2 und der Steuerung zellulärer Funktionen. Ein grundsätzliches Problem hierbei ist die enorme Pleiotropie der *luxS*-Mutation, die zwar nicht letal ist, aber den gesamten Zellstoffwechsel mehr oder minder stark beeinflusst.

Bei *S. mutans* ist es uns gelungen, durch die Komplementation der *luxS*-Mutante mit synthetischem AI-2 gleichzeitig die metabolische Funktion des LuxS-Enzyms und die Signalfunktion von AI-2 auf der Ebene der Transkription zu analysieren. Es wurden Proteine identifiziert, die für die Aufnahme von AI-2 und für die Regulation der AI-2-abhängigen Transkription verantwortlich sein könnten. Im Falle der Verifikation der gefundenen Targets öffnet sich ein völlig neuer Zugang zur Analyse von AI-2. Zum Beispiel könnte man Reporterstämme konstruieren, bei denen AI-2-induzierte Promotoren mit Fluoreszenzproteinen gekoppelt sind, und damit *in situ*-Kommunikation in den komplexen mikrobiellen Gemeinschaften der Mundhöhle beobachten. ■

Literatur

- [1] Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J. U. (2007): Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 230–239.
- [2] Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M., Hardie, K. R. (2005): Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 383–396.
- [3] Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2004): *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol. Cell* 15: 677–687.
- [4] Sun, J., Daniel, R., Wagner-Dobler, I., Zeng, A. P. (2004): Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC. Evol. Biol.* 4: 36.
- [5] Bodor, A., Elxnat, B., Thiel, V., Schulz, S., Wagner-Dobler, I. (2008): Potential for *luxS* related signalling in marine bacteria and production of autoinducer-2 in the genus *Shewanella*. *BMC. Microbiol.* 8: 13.
- [6] Sztajner, H., Lemme, A., Vilchez, R., Schulz, S., Geffers, R., Yip, C. Y., Levesque, C. M., Cvitkovitch, D. G., Wagner-Döbler, I. (2008): Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. *J. Bacteriol.* 190: 401–415.
- [7] Vilchez, R., Lemme, A., Thiel, V., Schulz, S., Sztajner, H., Wagner-Döbler, I. (2007): Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 489–496.
- [8] Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J. Jr., Rickard, A. H., Jakobovics, N. S., Chalmers, N. I., Diaz, P. I. (2006): Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2000 42: 47–79.
- [9] Senadheera, M. D., Lee, A. W., Hung, D. C., Spatafora, G. A., Goodman, S. D., Cvitkovitch, D. G. (2007): The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J. Bacteriol.* 189: 1451–1458.
- [10] Sperandio, V., Torres, A. G., Giron, J. A., Kaper, J. B. (2001): Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 183: 5187–5197.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. I. Wagner-Döbler
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
AG Mikrobielle Kommunikation
Inhoffenstraße 7
D-38124 Braunschweig
Tel.: 0531-6181-3080
Fax: 0531-6181-3096
iwd@helmholtz-hzi.de

AUTOREN



Helena Sztajner

Promotion in technischer Mikrobiologie an der Universität Breslau, Polen. Nach einem Postdoctoral-Training am Cranfield Institute of Technology (UK) Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Seit 2004 Mitarbeiterin in der AG Mikrobielle Kommunikation



André Lemme

Studium der Chemie/Pharmatechnik an der FH Magdeburg-Stendal. Anschließend Aufbaustudium Biotechnologie an der TU Braunschweig. Seit 2007 Doktorand in der AG Mikrobielle Kommunikation am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung.



Irene Wagner-Döbler

Studium der Biologie und Promotion in Ökologie an der Universität München. Anschließend Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig im Bereich Mikrobiologie. Seit 2004 Leiterin der AG Mikrobielle Kommunikation. Apl. Professorin für Mikrobiologie an der TU Braunschweig.