

Choleratoxin und Ursprung der Cholera-Erkrankung

Joe Francis¹ und Todd Charles Wood²

Die mit * gekennzeichneten Begriffe werden im Glossar erklärt.

Zusammenfassung: Herkömmliche medizinische Interpretationen legen nahe, dass bakterielle Krankheitserreger Säugetiere und Menschen durch infektiöse Prozesse ausbeuten. Allerdings haben viele Krankheitserreger in ihrer ursprünglichen natürlichen Umgebung nützliche Funktionen. Daher könnte man Infektionskrankheiten auch als eine Fehlentwicklung im Leben von Bakterien auffassen, die sich bisher nur an ihre eigentlichen Lebensbereiche angepasst hatten, nun aber plötzlich in Nischen auftauchen, in die sie normalerweise nicht gehören, z.B. in ein Säugetier als Wirt. Damit würden in solchen Fällen aus harmlosen Bewohnern anderer Lebensbereiche gefährliche Krankheitserreger. Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir die Literatur auf Hinweise darauf, ob es einen ökologischen Nutzen im Lebenszyklus des bekannten Krankheitserregers *Vibrio cholerae* gibt.

Im Laufe der letzten Jahrhunderte war dieses Bakterium für einige größere Cholera-Epidemien verantwortlich. Neuere Hinweise zeigen, dass die Mehrzahl der *Vibrio*-Arten wichtige ökologische Rollen in allen größeren Ozeanen und den damit in Verbindung stehenden Wasserwegen spielt. Tatsächlich sind viele der Virulenzfaktoren* von *V. cholerae* am Abbau von Chitin beteiligt. Chitin ist eine wesentliche Komponente im Außenskelett aquatischer (wasserlebender) wirbelloser Tiere (z.B. Krebs- und Schalentiere), und sein Abbau spielt im Nährstoffkreislauf der Ozeane eine wichtige Rolle. Das Choleratoxin (CT), der gefährlichste Virulenzfaktor von *Vibrio cholerae*, ist allerdings nicht am Umsatz von Chitin beteiligt. Es scheint – bisherigen Erkenntnissen zufolge – auch keine Rolle in der aquatischen Lebensweise des Bakteriums zu spielen. Das CT erscheint in vielerlei Hinsicht als Vergiftungsfaktor ‚angelegt‘ worden zu sein.

Um den Ursprung der Giftigkeit von CT in einem gutartigen, nützlichen Bakterium zu erklären, schlagen wir vor, dass entweder (1) CT aus einer Quelle außerhalb von *V. cholerae* stammt, oder (2) CT eine nicht-toxische, zuträgliche Funktion für das Bakterium oder dessen tierischen Wirt besitzt. Die Häufigkeit bestimmter Kondons* im CT-tragenden Teil des Erbguts von *Vibrio cholerae* gibt Hinweise darauf, dass sowohl das CT, als auch ein nahe verwandtes Toxin aus *E. coli*, das Hitze-labile Toxin, möglicherweise ihren Ursprung in symbiontischen* *Vibrio*-Arten haben könnten. Analysen der Genexpression* des CT in *V. cholerae* zeigen

jedoch, dass es sowohl mit seinem bakteriellen Träger als auch mit eukaryontischen* Wirtszellen auf eine sehr spezifische und komplizierte Weise wechselwirkt. Dies legt nahe, dass das CT in der Tat dafür ‚gedacht‘ ist, von *V. cholerae* beherbergt und freigesetzt zu werden, um eukaryontische Zellen zu ‚vergiften‘. Wir legen mehrere spekulative Modelle dafür vor, wie dieses Toxin möglicherweise trotzdem eine zuträgliche Rolle innerhalb des aquatischen Ökosystems seines Trägerbakteriums spielen könnte.

Einleitung

Wo kommen krankheitserregende Mikroben* mit ihren oft verblüffend funktionalen, krankheits-erregenden Faktoren eigentlich her? Der hier behandelte Cholera-Erreger und sein Toxin ist nur ein Beispiel unter vielen und trotz aller faszinierenden Details bei weitem nicht das komplizierteste. Besitzen Mikroben solche komplexen Systeme ausschließlich, um Krankheiten hervorzurufen? Oder lassen sich Hinweise auf Funktionen finden, die in anderem Zusammenhang unschädlich oder gar nützlich sind? Muss die schädliche Wirkung durch Neuentstehung der gesamten Maschinerie erklärt werden, oder könnte sie auch durch einige wenige Änderungen von zuträglichen Eigenschaften abgeleitet werden?

Es gibt in der Tat Hinweise darauf, dass Krankheitserreger von frei lebenden, natürlich vorkommenden Bakterien abgeleitet sind (FRANCIS 2006). Veränderungen der Umwelt und ein Auftauchen dieser Mikroben in neuen ökologischen Nischen störten das ausbalancierte friedliche Zusammenleben oder die symbiontischen Beziehungen von Bakterien mit ihren bisherigen Partnern, d.h. Mikroben drangen in Bereiche vor, in die sie so nicht gehörten. Beispielsweise zeigen viele bakterielle Krankheitserreger genetische Veränderungen: In ihrem Erbgut fehlen Bereiche, oder es sind zusätzliche DNA-Stücke eingefügt. Diese sogenannten Deletionen oder Insertionen fördern dann die Ausprägung von Virulenzfaktoren (MORAN 2004; EHRLICH et al. 2008). Weiterhin haben viele pathogene* Bakterien, Viren und Pilze wichtige und nützliche Rollen in der Umwelt. Wenn sie aber aus ihrer normalen Umgebung in eine andere – wie z.B. in einen Säugetierwirt – versetzt werden, können sie zu Krankheitserregern werden (ZIMMER 2008, S. 61; FRANCIS 2009). Um diese Fragen zu erforschen,

¹ The Master's College, 21726 Placerita, Santa Clarita, CA 91321, USA

² Center for Origins Research, Bryan College, 758 Upper Cove Loop Road 6, Dayton, TN 37321, USA

untersuchten wir die verschiedenen Lebensweisen des pathogenen Bakteriums *Vibrio cholerae* daraufhin, ob es zusätzlich zu seiner bekannten Fähigkeit, eine menschliche Krankheit zu verursachen, auch eine ‚gutartige‘, nicht krankmachende Lebensweise besitzt.

Vibrio cholerae ist eine von 72 derzeit bekannten *Vibrio*-Arten, die zur Familie der Vibrionaceae gerechnet werden. *V. cholerae* ist der Verursacher der Cholera-Seuche, die weltweit Millionen von Menschen betrifft. Seit Anfang des 19. Jahrhunderts zählte man sieben Cholera-Epidemien (FARUQUE & NAIR 2006). Das Bakterium produziert mehrere Virulenzfaktoren, die an der Entstehung der Cholera beteiligt sind. Aufgrund dieser krankheitsverursachenden Eigenschaft wurde *V. cholerae* zumeist nur mit der menschlichen Lebensweise in Verbindung gebracht; allerdings konnten Arbeiten der letzten Jahrzehnte zeigen, dass *Vibrio*-Arten viele aquatische Lebensräume (d. h. im Wasser) dominieren und an deren Nährstoffkreisläufen beteiligt sind. Das betrifft auch *V. cholerae*, welches durch den Abbau von Chitin eng in die Kohlenstoff- und Stickstoffzyklen der Meere eingebunden ist (NALIN 1979; MEIBOM et al. 2004, 2005).

Chitin ist die wesentliche Komponente des Außenskeletts der Gliedertiere und stellt daher neben der Zellulose eines der häufigsten Makromoleküle der Erde dar. Mehrere Virulenzfaktoren von *V. cholerae*, die im Menschen zur Erkrankung führen, sind am Chitinabbau beteiligt (KIRN et al. 2005), d.h., sie sind in der vermutlich ursprünglichen Nische nützlich. Die meisten *Vibrio*-Arten kommen in aquatischen Lebensräumen vor, ohne Krankheiten zu verursachen. Auch bei der Cholera müssen mehrere Bedingungen in Wirt und Umgebung vorhanden sein, damit es überhaupt zu einem Ausbrechen der Krankheit kommt (FARUQUE et al. 2005; KING et al. 2008). Denn obwohl *V. cholerae* sehr häufig in den Wasserstraßen und Flussmündungen der ganzen Welt vorkommt, verursacht es eher selten Cholera (COLWELL 2006). Es gibt einige Hinweise darauf, dass *V. cholerae* besser an seinen aquatischen Lebensstil und seine Rolle beim Chitinabbau angepasst ist als an die menschlichen Eingeweide, denn es verbleibt nicht sehr lange im menschlichen Darm. Allerdings ist ausgerechnet das wichtigste Toxin des Cholera-Erregers, das Choleratoxin (CT), anscheinend *nicht* am Chitinabbau beteiligt. Im Gegenteil: CT besitzt einige Eigenschaften, die nahe legen, dass es eher eine Funktion in den umschlossenen Hohlräumen eines Vielzellerdarms besitzen könnte als im freien aquatischen Ökosystem (KUZIEMKO et al. 1996). Auch genetische Analysen scheinen das zu bestätigen: Obwohl CT ursprünglich gar nicht aus *V. cholerae* zu stammen scheint, also höchstwahrscheinlich ein fremdes genetisches Element darstellt (s.u.), wird die Expression* der CT-Gene in *V. cholerae* durch ein hochkoordiniertes System aktiviert (SANCHEZ &

HOLMGREN 2008). Auch Sequenzanalysen* dieser Gene deuten auf eine engere Beziehung zu symbiontischen *Vibrio*-Arten hin. Weiterhin besitzt das CT starke Ähnlichkeiten mit dem Hitze-labilen Toxin (LT) von *Escherichia coli*, einem menschlichen Darmbakterium.

In diesem Artikel vergleichen wir die verschiedenen Lebensweisen von *V. cholerae* (aquatisch oder krankheitserregend) und stellen sie im Hinblick auf den Ursprung des Choleratoxins und seiner Funktionen einander gegenüber.

Eine kurze Geschichte der Cholera

Eine Cholera-artige Krankheit kann bereits im alten Griechenland nachgewiesen werden (REIDL & KLOSE 2002). Mitte des 19. Jahrhunderts wurde Cholera als eine bakterielle Erkrankung erkannt und daraufhin als Verursacher der Epidemie identifiziert, die 1817 in Indien begann. In der Tat hat die Theorie, dass Krankheiten durch Keime verursacht seien (und nicht durch Störungen der inneren Körpersäfte) ihre Wurzeln in der Entdeckung des Cholera-Bakteriums im 19. Jahrhundert (COLWELL 2006). Drei Wissenschaftler spielten wesentliche Rollen in der Entdeckung der Cholera-Bakterien: John Snow, der Arzt der britischen Königin, der zeigte, dass Cholera durch Wasser und nicht durch Nebel oder Dämpfe übertragen wird; Filippo Pacini, ein Medizinstudent aus Italien, der das Bakterium erstmals 1854 beobachtete; und Robert Koch, der *V. cholerae* 1883 im Detail beschrieb und anmerkte, dass es sich um ‚ein kommaförmiges Bakterium‘ handelt (REIDL & KLOSE 2002).

Es wird geschätzt, dass in den letzten beiden Jahrhunderten Millionen Menschen an dieser Krankheit gestorben sind. Gegenwärtige Schätzungen gehen davon aus, dass jährlich Hunderttausende von Fällen auftreten, eventuell sogar Millionen (FARUQUE & NAIR 2006). Derzeit liegt der Brennpunkt der siebten Epidemie in Südostasien (Abb. 1). Die Krankheit verbreitet sich typischer-



Abb. 1: Cholera-Patienten in Bangladesch. Foto: Ärzte ohne Grenzen.

Glossar

Adenylatcyclasen (AC): an die Zellmembran gebundene → Enzyme, die aus dem energiereichen Baustein Adenosintriphosphat (ATP) cyclisches Adenosinmonophosphat (→ cAMP) herstellen

ADP: Adenosindiphosphat, ein Baustein der DNA. Während Adenosinmonophosphat (AMP) eine Phosphatgruppe aufweist, ist diese bei ADP mit einer weiteren Phosphatgruppe verknüpft. Bei Adenosintriphosphat (ATP), das auch als Haupt-Energieträger der Zelle und als Regulator energieliefernder Prozesse fungiert, ist eine dritte Phosphatgruppe angefügt.

ADP-Ribosylierungsaktivität: eine Eigenschaft von ADP-Ribosyltransferasen genannten → Enzymen. Sie ermöglichen eine Anheftung von → ADP an andere Proteine; diese Aktivität spielt bei vielen Kontroll- und Signal verarbeitenden Prozessen der Zelle eine wichtige Rolle.

Antirepressor: ein regulatorisches Protein, das die Wirkung von → Repressor-Proteinen aufhebt; letztere verhindern durch ihre Bindung an DNA das Ablesen bestimmter Gene. Ein Antirepressor hebt diese Wirkung auf, indem er an den → Repressor bindet und bewirkt, dass dieser die DNA zum Ablesen freigibt.

Biofilm: eine Zusammenballung von Mikroorganismen, die aneinander und/oder an einer Oberfläche anhaften und häufig eine Matrix schleimiger Substanzen (typischerweise aus Zucker und Proteinen bestehend) ausscheiden. Dieser Schleim hält sie besser zusammen bzw. an einer Oberfläche fest.

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat (eine Phosphatgruppe überbrückt zwei Hydroxylgruppen (-OH) und bildet dadurch ein ringförmig geschlossenes Element) ist ein Botenstoff der Zellen vieler Organismen, der in zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, insbesondere bei der zellinternen Signalübertragung.

chemotaktisch = durch Chemotaxis: zielgerichtete Bewegung von Bakterien oder anderen Organismen in Richtung bestimmter Chemikalien in der Umgebung (z.B. Nährstoffe, Sexuallockstoffe) oder davon weg (z.B. Gifte)

Endoplasmatisches Retikulum (ER): ein → Zellkompartiment → eukaryotischer Zellen, das aus einem reich verzweigten Membransystem besteht. Im und am ER finden – neben vielen anderen Aufgaben – Herstellung, Faltung, Modifikation und Transport von Proteinen in andere → Zellkompartimente statt. Außerdem transportiert das ER falsch gefaltete Proteine zwecks Zerstörung ins Zellplasma, was das Cholera-

toxin sich zu nutze macht, jedoch ohne dabei Schaden zu leiden.

Enzyme: Proteine, die als Katalysatoren wirken, d.h. sie beschleunigen oder ermöglichen biochemische Reaktionen im Stoffwechsel. Sie sind für die meisten Stoffwechselprozesse aller Lebewesen zuständig; durch ihre An- oder Abwesenheit oder ihren Aktivierungszustand können Stoffwechselreaktionen gesteuert werden.

Eukaryonten (oder Eukaryoten): alle Lebewesen, die einen echten Zellkern mit Membranhülle besitzen, d.h. alle außer Bakterien und Archaeobakterien

Expression: → Genexpression

filamentöser Phage: ein Typ von Phage (Bakterien befallendes Virus), der wie ein fadenförmiges Stäbchen aussieht, und dessen Erbgut normalerweise aus einzelsträngiger DNA besteht

genetische Elemente: mobile DNA-Stücke oder Abschnitte, die sich im Erbgut umherbewegen können; dazu zählt z.B. von Phagen übertragene DNA.

Genexpression: das Ablesen von Genen auf der DNA, ihre Übersetzung in RNA und die Herstellung von Proteinen aufgrund der RNA-Vorlage

GM1-Gangliosid: Ganglioside sind so genannte Glykosphingolipide, die aus komplex verzweigten Zuckerbausteinen und langkettigen Fettsäuren bestehen. Sie sind in der Zellmembran integriert und modulieren die Signalübertragung der Zelle. Sie kommen in praktisch allen Wirbeltier-Zelltypen und auch in einigen Geweben von Wirbellosen vor. GM1 ist ein bestimmter Typ Gangliosid, das vor allem auch im Gehirn wichtige Funktionen ausübt.

Golgi-Apparat: Ähnlich dem → Endoplasmatischen Retikulum stellt er einen netzwerkartigen, membranumschlossenen Reaktionsraum innerhalb der Zelle dar. Seine Hauptaufgabe besteht in der Sekretion (Ausscheidung) von Substanzen (i.d.R. Proteine) aus der Zelle. Meistens übernimmt er Vesikel aus dem → Endoplasmatischen Retikulum, modifiziert die darin enthaltenen Proteine und schafft sie aus der Zelle. Im Fall des Cholera-toxins verläuft dieser Prozess jedoch in umgekehrter Richtung.

Glykoproteine: Proteine, die mit Zuckerbausteinen versehen sind (letztere können auch als kettenförmige oder verzweigte Zuckerketten ausgeprägt sein). Sie können vielfältige Aufgaben haben, unter anderem als Membranproteine bei der Zellerkennung oder als Bestandteile des Immunsystems.

G-Proteine: eine Familie von Proteinen, die Guanin-Nukleotide (wie ATP sind diese

auch Bestandteile der DNA) bindet. Durch Umschalten zwischen der inaktiven Form mit Guanosin-Diphosphat (GDP) und der aktiven Form mit Guanosin-Triphosphat (GTP) spielen sie eine wesentliche Rolle in der Regulation zahlreicher Prozesse innerhalb der Zelle, insbesondere bei der Weiterleitung von Signalen, wie sie z.B. durch Hormone ausgelöst werden. Im Fall des Cholera-toxins kommt ein so genanntes stimulatorisches G-Protein (Gs) zum Einsatz. Cholera-toxin bewirkt durch die Übertragung von ADP auf eine aktive Stelle der α -Untereinheit dieses Gs-Proteins (siehe Abb. 4), dass GTP nicht mehr wie üblich zu GDP zurückgeschaltet wird, was die dauerhafte Aktivierung der α -Untereinheit und damit der gesamten Kaskade zur Folge hat.

horizontaler Gentransfer: Übertragung von Genen von einer Art auf eine andere, also nicht durch Vererbung auf Nachkommen derselben Art. In unserem Beispiel wurden möglicherweise die CT-Gene von einem unbekannten Bakterium durch einen Phagen auf *V. cholerae* übertragen.

Ionenkanäle: Proteine, die durch die Zellmembran hindurchragen und in ihrem Innern eine Pore bilden, durch die Ionen (elektrisch geladene Teilchen, aus denen Salze bestehen) durch die Membran gelangen können. Sie spielen wesentliche Rollen für Transportprozesse und bei der Nervenleitung.

Kodon/Kodongebrauch: Die Abfolge von drei DNA-Bausteinen (Nukleotiden) in proteinkodierenden Genabschnitten wird Kodon genannt. Durch solche Dreierkombinationen (Tripletts) werden bestimmte Aminosäuren kodiert. Vier Nukleotide ergeben 64 Möglichkeiten, es gibt aber nur 20 Aminosäuren, sodass die meisten durch mehr als ein Triplet kodiert werden. Der Kodongebrauch bei verschiedenen Organismen bezeichnet die Häufigkeit, mit der bestimmte Tripletts für die Kodierung von Aminosäuren benutzt werden. Dabei kann es deutliche Unterschiede von Art zu Art geben ('codon usage bias'). Auch wenn die Gründe für solche Präferenzen noch nicht gut verstanden sind, kann man aus ihnen u.U. schließen, aus welchen Organismen → horizontal übertragene Gene ursprünglich stammen könnten.

Mikroben (Synonym Mikroorganismen): mikroskopisch kleine Lebewesen, die mit bloßem Auge nicht zu erkennen sind, meist Einzeller (z.B. Bakterien, Hefepilze, Mikroalgen, Pantoffeltierchen, Amöben)

Osmoregulation: aktive Regulation des osmotischen Gleichgewichts in einem Organismus, die den Salzgehalt der Körperflüssigkeiten in der richtigen Konzentration hält,

unabhängig vom Salzgehalt der Umgebung. Z.B. scheiden Fische, die im Meerwasser leben, über Kiemen oder Urin überschüssiges Salz aus. Da ihre Körperflüssigkeiten weniger salzhaltig sind als das Meerwasser, würden sie ohne diese Gegensteuerung ständig Wasser verlieren. Dagegen müssen Süßwasserfische Salz aufnehmen.

pathogen/Pathogen: Organismus (z.B. Virus, Bakterium oder Pilz), der in einem befallenen Wirt eine Krankheit auslöst bzw. auslösen kann.

Pilus: Sammelbegriff für fädige Anhängsel von Bakterien. Es gibt viele verschiedene Pili; manche dienen dem Anheften an Oberflächen, andere der Übertragung von DNA von einem Bakterium auf ein anderes, da sie hohl sein können. Typ IV-Pili dienen u.a. der Fortbewegung. Viele Phagen (Bakterien-viren) nutzen Pili zum Andocken und Einspritzen ihres Erbguts in ein Bakterium.

Plankton: Sammelbegriff für Organismen, die im freien Wasser – häufig nahe der Oberfläche – treiben oder schweben, und sich nicht effizient gegen die Strömung bewegen können. Die meisten sind klein (z.B. Bakterien, Algen, kleine Krebstiere), aber auch Quallen und Eier oder Larven größerer

Tiere gehören dazu. Tierisches Plankton wird auch Zooplankton genannt. Plankton ist essenziell als das erste Glied der Nahrungskette im Meer, und das pflanzliche Plankton stellt etwa die Hälfte des gesamten Sauerstoffs der Erde her. Viele Plankton-Organismen sind auch an den Stoffkreisläufen der Ozeane beteiligt wie im Beispiel der *Vibrio*-Arten.

Repressor: regulatorisches Protein, das an bestimmte Stellen der DNA bindet und dadurch das Ablesen von Genen blockiert. Es kann durch Signalfstoffe oder andere Proteine (→ Antirepressor) aktiviert oder deaktiviert werden.

Rezeptor: Auf biochemischer Ebene ist dies ein Protein oder Proteinkomplex, der entweder aus der Oberfläche der Zellmembran herausragt oder sich im Innern der Zelle befindet. Er kann Signale empfangen (z.B. von Hormonen, Arzneimitteln oder auch Giften wie im Fall des Cholera-toxins) und ist u.U. an → G-Proteine oder direkt an → Ionenkanäle gekoppelt. Wenn er an einen Signalfstoff bindet, ändert er seine räumliche Gestalt und löst dadurch eine Kaskade von Ereignissen in der Zelle aus.

Sequenz: in der Biologie die Abfolge von

Bausteinen in der DNA (Nukleotide) oder in Proteinen (Aminosäuren)

symbiotisch: eng verflochtene Lebensweise zweier unterschiedlicher Organismen mit gegenseitigem Nutzen, z.B. Algen und Pilze in Flechten, oder Magen- und Darmbakterien in Tieren, die helfen, die Nahrung aufzuschließen und die dafür vom Tier mit Nährstoffen versorgt werden. Bei sehr unterschiedlicher Größe der beteiligten Organismen bezeichnet man oft den größeren der beiden als Wirt.

Virulenzfaktor: alle Faktoren, die für die Entstehung einer Krankheit in einem Wirtsorganismus nötig sind. Fehlen diese Faktoren oder einige davon, sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, eine Krankheit auszulösen. Virulenzfaktoren gehören sehr vielen Klassen an: → Enzyme, Anheftungsfaktoren, Toxine, Eisenaufnahme-Systeme usw.

Zellkompartimente: verschiedenartige, durch Membranen voneinander getrennte Räume innerhalb der Zelle von → Eukaryoten, z.B. Zellkern, → Golgi-Apparat, Mitochondrien, → Endoplasmatisches Retikulum, Zellplasma.

weise *nicht* durch direkten Kontakt von Person zu Person. Die primäre medizinische Behandlung ist lediglich eine Rehydrierung, d.h. eine kontrollierte Zufuhr großer Flüssigkeitsmengen. Ansonsten verliert der mit Cholera infizierte Körper innerhalb weniger Stunden enorme Mengen an Wasser (in der Regel zwischen 0,5 und 1 Liter, im Extremfall bis über 1,5 Liter pro Stunde; SANCHEZ & HOLMGREN 2008), was rasch zum Delirium und zum Tod führen kann.

Vibrio-Arten und der aquatische Lebensstil

Von den 72 *Vibrio*-Arten sind nur zwölf (17%) bekannt, die mit menschlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Die meisten *Vibrio*-Arten – ob pathogen oder nicht – sind aquatisch und leben entweder freischwimmend oder sessil (festsitzend), indem sie sich an Plankton und Schalentiere anheften. Die meisten Arten sind nur aus marinen Lebensräumen bekannt (URAKAWA & RIVERA 2006). *Vibrios* sind weit verbreitet in unterschiedlichen Gewässern (Frisch-, Brack- und Tiefseewasser), wobei es Hinweise gibt, dass die höchsten Konzentrationen von *Vibrio*-Bakterien in Küstengewässern auftreten. Salzwasser ist sehr wahrscheinlich ihr natürlicher Lebensraum, da die ganze Gruppe relativ viel Natrium (Kochsalz ist Natriumchlorid) benötigt, um leben zu können. Am

häufigsten sind die Bakterien in warmem Wasser, wodurch ihre Anzahl starken saisonalen Schwankungen unterliegt; tendenziell repräsentieren sie die dominierenden Arten des bakteriellen Planktons* während der Sommermonate (URAKAWA & RIVERA 2006). Mehrere symbiotische Lebensbeziehungen zwischen *Vibrio*-Arten und marinen (meerischen) Tieren sind dokumentiert. In der Blaukrabbe (*Callinectes sapidus*) oder den Abalonen (auch Seeohren oder Irismuscheln genannt, Gattung *Haliotis*), gehören sie zur normalen Flora des Verdauungstrakts; und auch in der Turbanschnecke (*Turbo cornutus*) wurden sie gefunden (URAKAWA & RIVERA 2006). Sie kommen auch auf vielen Fischarten vor, aber innerhalb der Wirbeltiere bieten nur Haie einen besonderen Lebensraum für sie (URAKAWA & RIVERA 2006). Eine besonders ausgefeilte symbiotische Beziehung besteht zwischen *Vibrio fischeri* und dem nachtaktiven hawaiianischen Tintenfisch *Euprymna scolopes* (Abb. 2). *V. fischeri* bewohnt ein spezialisiertes Leuchtorgan im Tintenfisch und produziert darin Licht (Biolumineszenz). Man vermutet, dass der Tintenfisch dadurch vor Raubfischen geschützt wird, weil das Licht den unterhalb von ihm schwimmenden Fischen als Mondlicht erscheinen mag (NYHOLM & McFALL-NGAI 2004).

Mehrere *Vibrio*-Arten sollen durch den Abbau von Chitin größere Rollen in den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatzyklen der Meere spielen (THOMPSON & POLZ 2006). Beispielsweise scheidet *V. harveyi* zehn verschiedene Chitin-abbauende

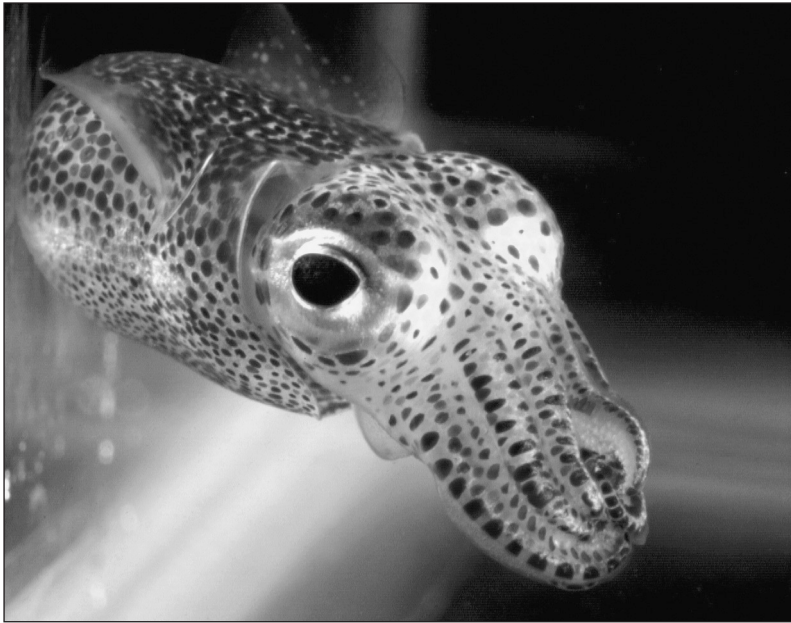
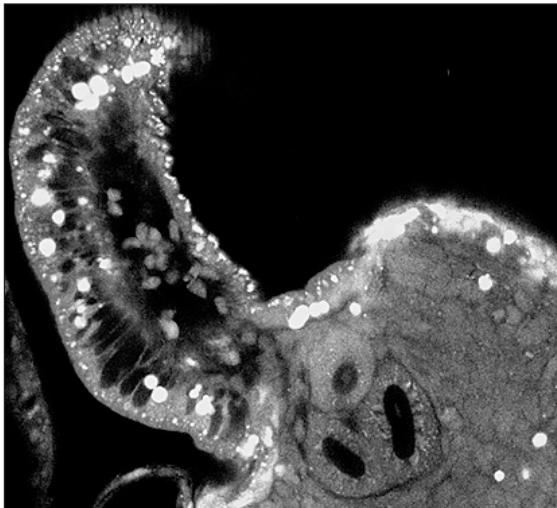


Abb. 2: Der nacht-
aktive hawaiianische
Tintenfisch *Euprymna
scolopes* („Hawaiian
bobtail squid“) und
sein Leuchtorgan
(rechts).
Oben: William
ORMEROD / Courtesy
Margaret McFALL-
NGAI;
unten: *Current Biology*,
vol. 18, Elsevier.



Enzyme* aus, von denen anscheinend jedes einen besonderen Subtyp von Chitin abbaut (OWENS & BUSICO-SALCEDO 2006).

Auch wenn die krankheitsverursachende Fähigkeit von *V. cholerae* lange im Mittelpunkt des Interesses an seiner Lebensweise stand, begannen sich Mitte des 20. Jahrhunderts Studien zu häufen, die auch seine Rolle in aquatischer Umgebung behandelten. Inzwischen postuliert man, dass auch *V. cholerae* durch den Abbau von Chitin an mehreren Nährstoffkreisläufen aquatischer Systeme beteiligt ist. Das ist deswegen plausibel, weil *V. cholerae* in aquatischen Umgebungen häufig ist, chitinabbauende Enzyme ausscheidet und mehrere Mechanismen besitzt, die seine Anheftung an chitinhaltige Oberflächen von Schalentieren und Plankton fördern (COLWELL 2006). Eine neuere Studie zeigte, dass *V. cholerae* 41 Gene besitzt, die gemeinsam reguliert werden; sie sind an der Besiedlung von Chitin sowie an dessen Verdauung, Transport und Aufnahme ins Bakterium beteiligt. Dazu gehören auch Gene, die für ein fädiges Anhängsel

(einen sogenannten Typ IV-Pilus*) kodieren, das hilft, die abgegebenen chitinabbauenden Enzyme gezielt an die Chitinoberflächen zu dirigieren (MEIBOM et al. 2004). Zusätzlich kann *V. cholerae* Chitin auch chemotaktisch* wahrnehmen und bewegt sich gezielt darauf zu. Da viele natürliche Chitinoberflächen (z.B. bei Gliedertieren) mit einem nicht-chitinhaltigen Lack bedeckt sind, besitzt *V. cholerae* ein weiteres fädiges Anhängsel, einen sogenannten MSHA-Pilus, der sich auch an diesen Lack anheften kann (MEIBOM et al. 2004; PRUZZO et al. 2008). Sowohl für diesen MSHA-Pilus als auch für die Beweglichkeit von *V. cholerae* (das Bakterium bewegt sich mit Hilfe der Bakteriengeißel fort) wurde berichtet, dass sie u.a. auch als Virulenzfaktoren bei der Infektion von Menschen beteiligt sind (MEIBOM et al. 2005).

Vibrio cholerae und seine Virulenzfaktoren

Die Virulenzfaktoren von *V. cholerae* können in vier wichtige Gruppen eingeteilt werden: Bewegungsfaktoren, Anheftungsfaktoren, Kolonisierungsfaktoren und toxische Faktoren für das Eindringen in die Wirte. Bei einigen Vertretern der ersten drei Kategorien wurde kürzlich entdeckt, dass sie am Chitinabbau beteiligt sind. Zum Beispiel bewirken Anheftungsfaktoren nicht nur eine Bindung an die Darmschleimhaut von Wirten, sondern auch an Chitin (KIRN et al. 2005). Ein wesentlicher Faktor für Infektionen ist weiterhin der Toxin-Coregulierte Pilus (TCP), der auch eine wichtige Rolle bei der Besiedlung chitinöser Oberflächen durch *V. cholerae* spielt (REGUERA & KOLTER 2005). Auch im Falle von menschlichen Infektionen wird TCP von *V. cholerae* als Virulenzfaktor benötigt, aber die Art der Wechselwirkung mit den Darmzellen des menschlichen Wirts ist noch weitgehend unbekannt. Im Hinblick auf die ökologische Rolle von TCP wird postuliert, dass es auf chitinhaltigen Oberflächen die Bildung eines bakteriellen Biofilms* fördert, der hilfreich für die Abscheidung von Chitinabbauenden Enzymen ist (REGUERA & KOLTER 2005).

Interessanterweise ist ausgerechnet von Cholera toxin (CT), einem toxischen Faktor und gleichzeitig dem mächtigsten Virulenzfaktor von *V. cholerae*, keine Rolle im Chitinabbau bekannt. Er scheint tatsächlich ausschließlich dafür ‚gemacht‘ zu sein, in Zellen einzudringen, um sie zu vergiften. CT gehört zur Klasse der AB₅-Toxine. Das sind Proteine, die aus fünf B-Untereinheiten und einer A-Untereinheit bestehen. Die B-Untereinheiten binden an die Oberfläche der Wirtszelle und fördern die Aufnahme der eigentlich toxischen A-Untereinheit. Die A-Untereinheit ist ein Enzym, das die Biochemie der Zelle verändert (MASIGNANI et al. 2000; PATTON et al. 2000). Um Vergiftungssymptome hervorzurufen, muss CT zum einen auf eine sehr spezifische Weise mit den Zellen der mensch-

lichen Darmschleimhaut wechselwirken.¹ Zum anderen beinhalten bereits die Produktion von CT in *V. cholerae* und dessen Ausscheidung aus den Bakterien sehr komplexe Mechanismen, deren Herkunft sich einfachen Erklärungsversuchen entzieht.

Erwerb und Produktion von CT

Um den Erwerb und die Produktion von CT in Cholera-Bakterien zu verstehen, muss man wissen, dass das CT-Gen durch bakterielle Viren von einem Bakterium zum anderen übertragen wird, auch über Artgrenzen hinweg (horizontaler Gentransfer*). Viren, die Bakterien befallen, werden Phagen genannt. Allen Viren gemeinsam ist die Eigenschaft, dass sie auf eine Zelle angewiesen sind, in der sie sich vermehren können. Bevor ein Phage sein Erbgut in eine Bakterienzelle spritzen kann, um Nachkommen zu produzieren, muss er an der bakteriellen Oberfläche andocken. Häufig sind die fädigen Anhängsel der Bakterien (Pili, s.o.) solche Andock-Stellen. Im Bakterium angekommen, gibt es zwei generelle Möglichkeiten: Entweder sorgt das virale Erbgut sofort für die Herstellung neuer Viren oder es baut sich in das bakterielle Erbgut ein, wo es dann sozusagen ‚schläft‘, bis bestimmte Umweltbedingungen dafür sorgen, dass das Virus ‚erwacht‘ und seine eigene Herstellung auf Kosten des Bakteriums erzwingt.

Die CT-Gene kennzeichnen also nicht alle *V. cholerae*-Stämme, sondern sie finden sich nur in verhältnismäßig wenigen *V. cholerae*, die mit dem CTXΦ-Phagen infiziert sind (WALDOR & MEKALANOS 1996; BOYD et al. 2000). Der CTXΦ-Phage kann nur an solche *V. cholerae* andocken, die den Toxin-Coregulierten Pilus (TCP) herstellen. TCP ist also nicht nur ein Virulenzfaktor, der an der Besiedlung des Säugetierdarms beteiligt ist (s.o.), sondern gleichzeitig Andock-Stelle für den CTXΦ-Phagen. Der Phage trägt also die CT-Gene und baut sie an spezifischen Stellen ins *V. cholerae*-Erbgut ein (FULLNER & MEKALANOS 1999). Interessanterweise ist ein bestimmtes Gen des Phagen CTXΦ aber defekt, was dazu führt, dass dieser Phage nicht mehr in der Lage ist, von selbst zu ‚erwachen‘ und seine eigene Produktion anzustoßen. Das defekte Gen ist ein sogenannter Antirepressor*; das ist in diesem Fall ein Faktor, der das ‚Erwachen‘ von Phagen auslöst. Es gibt aber einen weiteren Phagen, der Cholera-Bakterien befällt, mit Namen RS1. Der Antirepressor dieses RS1-Phagen ist nicht defekt und gleichzeitig in der Lage, auch den CTXΦ-Phagen zu aktivieren. Die CT-Gene befinden sich also im Erbgut des CTXΦ-Phagen, und so lange der Phage ‚schläft‘, wird auch kein CT produziert. Bestimmte Umweltbedingungen, wie sie beispielsweise im Darm des Menschen vorkommen, aktivieren den Antirepressor von RS1. Dieser aktiviert gleichzeitig CTXΦ, und wenn dessen Produktion startet, wird

auch das CT hergestellt. Kurz gesagt, CT kann nicht hergestellt werden, ohne dass ein Antirepressor-Protein von einem anderen Phagen (RS1) bereitgestellt wird. RS1 wird aufgrund dieser Eigenschaft als Satelliten-Phage bezeichnet, den CTXΦ für seine eigene Herstellung benötigt (FARUQUE et al. 2003).

Wo findet nun die Infektion der Cholera-Bakterien mit den Phagen statt? Die Infektion von *V. cholerae* mit CTXΦ scheint außerhalb des menschlichen Körpers selten und außerdem in der Magen-Darm-Umgebung effizienter zu sein als anderswo (MILLER 2003). Es erscheint logisch, dass eine Phagen-Infektion in den umschlossenen Hohlräumen eines Verdauungstrakts viel effektiver erfolgen kann als im offenen Ozean, wo aufgrund von Verdünnungseffekten der Phage viel leichter vom Bakterium weggespült werden kann.

Da CT im Erbgut von *V. cholerae* ursprünglich ein fremdes genetisches Element ist – es wird ja erst durch den CTXΦ-Phagen übertragen – ist es verführerisch zu postulieren, dass das CT seinen Ursprung in einem anderen Bakterium hatte. Die Entstehung des CTs wird dadurch allerdings nicht erklärt, doch häufig wird argumentativ die Evolution eines solchen, horizontal übertragenen genetischen Elements in andere, noch unbekannte Organismen verlegt. Gegen einen Ursprung in einem anderen Bakterium spricht andererseits, dass es zahlreiche *V. cholerae* innewohnende Faktoren gibt, die mit CT auf sehr spezifische Weise zu interagieren scheinen. Sowohl Erwerb als auch Produktion, Reifung und Ausscheidung des CTs sind äußerst komplex koordiniert. Zum Beispiel ist der CTXΦ-Phage, der die CT-Gene trägt, ein Virus, das die befallene Bakterienzelle beim Verlassen nicht zerstört; vielmehr wird es durch einen sehr komplexen Apparat aus der Zelle ausgeschieden, ohne die Zellwand zu beschädigen (DAVIS et al. 2000). Diese Art der Freisetzung des Phagen durch eine Pore erlaubt es dem Bakterium, intakt zu bleiben und dauerhaft CT zu produzieren und auszuschleiden.

Um die Produktion der beiden Haupt-Virulenzfaktoren TCP und CT anzustoßen, läuft zusätzlich im Cholera-Bakterium eine komplexe Kaskade genetischer Ereignisse ab. Sie wird durch mehrere Umweltfaktoren beeinflusst, die wiederum auf Regulationsfaktoren für TCP und CT einwirken. Diese Bedingungen sind erwiesenermaßen im Darm optimal, nicht aber im freien Wasser. Weiterhin beinhaltet die Regulationskaskade „eine faszinierende Mischung von Elementen, die von Verfahren übernommen oder kürzlich erworben“ wurden (REIDL & KLOSE 2002). Diese Elemente umfassen Gene des *V. cholerae*-Erbguts selbst, Gene vom CTXΦ-Erbgut und Gene eines weiteren genetischen Elements*, das den Namen ‚*Vibrio* pathogenicity island‘ (VPI) trägt (MATSON et al. 2007). Es würde zu weit führen, hier die Details dieser komplexen Regulation darzustellen.

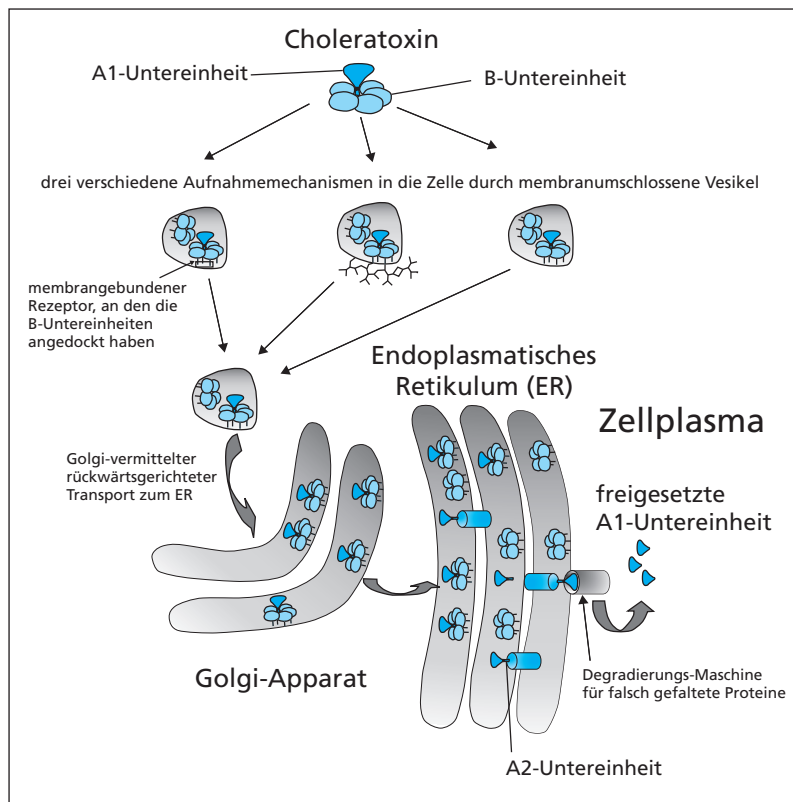


Abb. 3: Aufnahme des Cholera-Toxins in die Darmzelle. CT dockt mit Hilfe der B-Untereinheiten an einen Rezeptor der Zelle an, woraufhin sich die Zellmembran um das Protein herum einstülpt und verschiedene Arten von Vesikeln bilden kann. Diese verschmelzen mit dem Golgi-Apparat und werden von dort aus ins endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust. Dort trennen sich die A- von den B-Untereinheiten. Im ER wird dann die Degradierungs-Maschinerie für falsch gefaltete Proteine rekrutiert, die die toxische A1-Untereinheit aber unbeschadet übersteht und stattdessen ins Zellplasma entlassen wird. Verändert nach SANCHEZ & HOLMGREN (2008).

CT-Ausscheidung und Bindung an die Wirtszelle

Wie bereits erwähnt, wird das CT mit Hilfe des gleichen Sekretionsapparats aus *V. cholerae* ausgeschieden wie der CTXΦ-Phage selbst. Dieses System benötigt 14 Gene, und der gesamte Apparat sitzt vorzugsweise am selben Ende der Zelle wie die Bakteriengeißel (DAVIS et al. 2000). Wir vermuten, dass diese Anordnung helfen könnte, das Toxin zu den Wirtszellen zu dirigieren, denn eine Möglichkeit zur Anheftung der Bakterien vermittelt die Bakteriengeißel. Zusätzlich wird der CTXΦ-Phage, verglichen mit anderen filamentösen* Phagen, nur in geringen Mengen produziert. Das ist im Wesentlichen durch die Aktivität eines Repressors* in der Bakterienzelle bedingt (FARUQUE et al. 2003). Sowohl die Kontrolle der Ausscheidungsrate des Phagen als auch die zielgerichtete Sekretion von CT könnten nahelegen, dass die Vergiftung durch *V. cholerae* dazu ‚gedacht‘ ist, in der Nähe bestimmter Wirtszellen zu erfolgen.

Viele Bakterien, so auch *V. cholerae*, besitzen eine doppelte Zellmembran, die das Innere der Zelle von der äußeren Umgebung trennt. Zwischen beiden Membranen befindet sich ein zusätzlicher Raum, das Periplasma. Das CT-Protein wird im

Inneren der Bakterienzelle produziert und durch ein allgemeines Sekretionssystem über die erste Membran in den periplasmatischen Raum ausgeschieden. Dort beginnt die Kette von Aminosäuren, aus denen das Protein besteht, sich in die richtige räumliche Struktur zu falten; teilweise gefaltet wird es dann über die zweite Zellmembran geschleust. Erst wenn es sich komplett außerhalb der Bakterienzelle befindet, vollendet das Toxin seine Faltung. Die A-Untereinheit ist aber noch nicht aktiviert; sie muss erst durch ein Enzym in zwei Teile, A1 und A2, geschnitten werden, was für die Wirkung des Toxins wesentlich ist (HIRST 1999). Diese Spaltung kann außerhalb der Bakterienzelle oder sogar erst in der Wirtszelle erfolgen. Es sieht so aus, als ob es hier mehrere Sicherungsmechanismen gäbe, die das Toxin daran hindern, vorzeitig aktiviert zu werden und dadurch womöglich die *V. cholerae*-Zelle zu zerstören.

Aufgrund der komplizierten CT-Aktivierung und -Ausscheidung erscheint es logisch anzunehmen, dass die Bindung des CT sehr spezifisch ist in Bezug auf die Zelle, die es infiziert. Dies ist jedoch nicht der Fall. Der primäre Rezeptor ist zwar das GM1-Gangliosid*, aber es konnte gezeigt werden, dass die B-Untereinheit des Toxins (die im Wesentlichen für die Bindung verantwortlich ist) auch an mehrere andere Glykoproteine* bindet (KUZIEMKO et al. 1996; BLANK et al. 2007). Vielleicht soll diese mangelnde Spezifität sicherstellen, dass CT auch wirklich an ein Zielgewebe bindet.

CT-Vergiftung der Darmzellen

Nach Bindung an die Oberfläche der Darmzelle geleiten die B-Untereinheiten des Toxins die A-Untereinheit(en) durch die Zellmembran der Wirtszelle. Dabei lösen die B-Untereinheiten drei verschiedene Mechanismen aus, die normalerweise den Zellen helfen, Stoffe aus ihrer Umgebung aufzunehmen (Abb. 3). Das CT kann über alle drei Mechanismen aufgenommen und zu einem bestimmten Membrankomplex der Wirtszelle, dem Golgi-Apparat*, verfrachtet werden. Der Golgi-Apparat ist für die Synthese von Membranproteinen in eukaryontischen Zellen wichtig, und normalerweise bewegen sich neu erzeugte Proteine in eine bestimmte Richtung, um dann an die einzelnen Zellkompartimente* „verschickt“ zu werden, die Membranproteine benötigen. Das CT befindet sich also zunächst in kleinen Membranbläschen (Vesikeln), durch die es aufgenommen wurde. Diese Bläschen verschmelzen mit dem Membransystem des Golgi-Apparates, und das Toxin bewegt sich nun entgegen der normalen Richtung neu synthetisierter Membranproteine in den Golgi-Apparat hinein. Dabei ist es wahrscheinlich auf die Unterstützung mehrerer Wirtszellfaktoren angewiesen

(DE HANN & HIRST 2004; VANDEN BROECK et al. 2007). Schließlich erreicht das CT die Synthesefabrik für Membranproteine, das sogenannte Endoplasmatische Retikulum* (Abb. 3). Dort angekommen, trennt sich die A1-Untereinheit vom Gesamtprotein, ihre Aminosäurekette faltet sich auf und betritt einen Abbauweg für falsch gefaltete Proteine. Bemerkenswerterweise wird sie aber nicht abgebaut (die meisten falsch gefalteten Proteine werden verdaut), sondern stattdessen ins Zellplasma entlassen. Sobald die ‚giftige‘ A1-Untereinheit dort ankommt, setzt sie eine Kaskade von weiteren Ereignissen in Gang (Abb. 4): Sie überträgt ADP* auf ein sogenanntes G-Protein*, das wiederum die Adenylatcyclase* der Wirtszelle kontrolliert. Letztere ist ein Enzym, das den zellulären Botenstoff cAMP* herstellt. Die Anheftung von ADP an eine bestimmte Stelle dieses G-Proteins bewirkt, dass dieses und damit auch die Adenylatcyclase *dauerhaft* stimuliert werden. Das Ergebnis ist eine Überproduktion an cAMP, das nun permanent die Öffnungswahrscheinlichkeit bestimmter Ionenkanäle* erhöht. Dadurch wird wiederum ein massiver Verlust von Salzen und Wasser aus den Darmschleimhäuten verursacht.

Mögliche nützliche Rollen für CT

Die komplizierte Weise, wie CT in *V. cholerae* produziert und aus der Bakterienzelle ausgeschieden wird, sowie die Komplexität, mit der es mit eukaryontischen Zellen interagiert, legen die Annahme nahe: Das CT ist tatsächlich dafür ‚vorgesehen‘, von Bakterien ausgeschieden zu werden, um in Wechselwirkung mit eukaryontischen Zellen zu treten. Die Rolle von CT als ein tatsächlicher ‚Vergiftungsfaktor‘ von Wirtstieren wird weiterhin dadurch unterstützt, dass es – soweit bisher bekannt – an der aquatischen Lebensweise von *V. cholerae* nicht beteiligt ist. Dazu kommt, dass die Vergiftung menschlichen Gewebes durch CT und der Ausstoß aus dem Darm dem *Bakterium*, dass das Gift beherbergt, anscheinend wenig nützen (COLWELL 2006).

Könnte die Vergiftung des Darms auch eine Funktion erfüllen, die für die *aquatische* Lebensweise des *V. cholerae*-Bakteriums vorteilhaft ist? Interessanterweise heftet sich *V. cholerae* an die chitinösen Darmauskleidungen der Blaukrabbe (Abb. 5) an und lebt dort als harmloses Darmbakterium² (HUQ et al. 1986). Obendrein lebt die Blaukrabbe in Mündungsgebieten von Flüssen und schwimmt zwischen Salz- und Brackwasser verschiedener Salzkonzentrationen hin und her. Dass *V. cholerae* an die Oberfläche des Krabbendarms bindet, haben COLWELL und Mitarbeiter bereits 1984 gezeigt. Sie sind der Meinung, dass *V. cholerae* sich dort in einer ausgezeichneten Position befindet, dem Wirt zu helfen, eindringendes über-

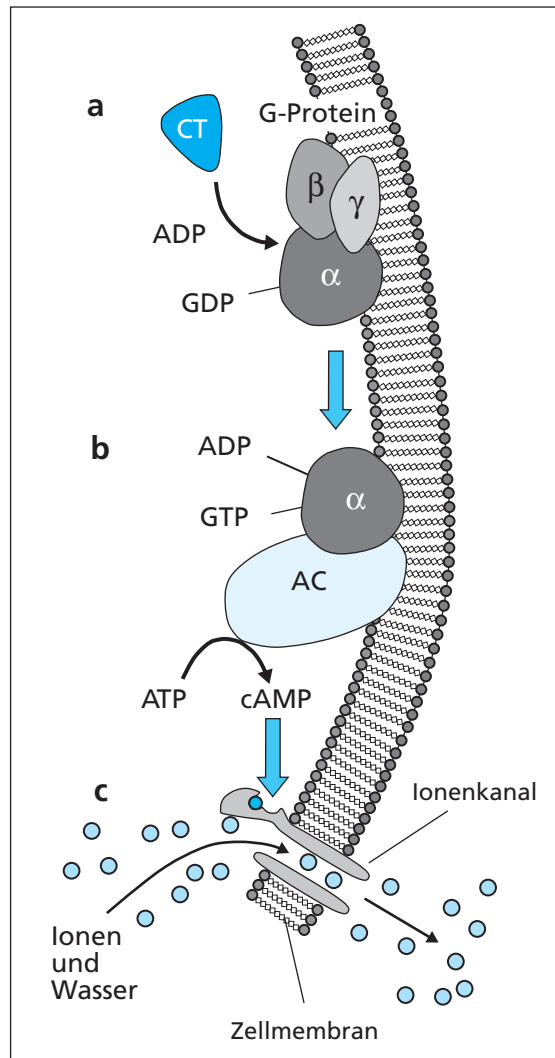


Abb. 4: Auslösung von Durchfall durch Cholera toxin (vereinfachtes Schema)

a) Die A1-Untereinheit des Cholera toxins (CT), die ADP-Ribosylierungsaktivität besitzt, überträgt eine ADP-Gruppe auf die α-Untereinheit eines G-Proteins. b) Die aktivierte α-Untereinheit assoziiert mit der Adenylatcyclase (AC), die dadurch dauerhaft aktiviert wird und ATP zu cAMP umsetzt. c) cAMP wiederum aktiviert Ionenkanäle der Zelle, was zu massivem Salz- und Wasserverlust führt.

schüssiges Salz zu entfernen, wenn die Krabbe von Gewässern mit niedrigen zu solchen mit hohen Salzkonzentrationen schwimmt. Da es so viele verschiedene *Vibrio*-Arten gibt, die wenigstens *einige* der regulatorischen Gene für die CT-Produktion besitzen, könnte man sich vorstellen, dass diese Unterstützung des Salzumsatzes ein weiter verbreitetes Phänomen sein könnte. Damit im Einklang stünde die Tatsache, dass viele Genregulationen in *V. cholerae* durch eine veränderte Salzkonzentration ausgelöst werden. Deshalb schlagen wir hier ein spekulatives Modell vor, wie eine nutzbringende Rolle des Cholera toxins möglicherweise aussehen könnte:

Spekulatives Modell für die Osmoregulation* bei Krebstieren durch *V. cholerae*

1. *Vibrio cholerae* leben vorwiegend unter Umweltbedingungen, wie sie in Mündungsregionen der Flüsse vorherrschen. Dort würde man sie auch erwarten, wenn diese Bakterien tatsächlich anderen Organismen beim Übergang von Brackwasser zu Salzwasser helfen.



Abb. 5: Die Blaukrabbe (*Callinectes sapidus*), ein „natürlicher“ Wirt von *V. cholerae*.
© John T. CONSOLI,
University of Maryland.

2. Der Wachstums- und Besiedlungserfolg von *V. cholerae* hängt von der Bindung an Chitin und von bestimmten Salzkonzentrationen ab. Ebenfalls in Reaktion auf veränderte Salzkonzentrationen scheiden die Bakterien ihr Toxin aus. Dessen Produktion wird aber bei zu hoher Bakterienkonzentration wieder abgeschaltet (s.u.) und verhindert dadurch eine Überlastung des Organismus (ZHU et al. 2002).

3. Die Freisetzung des Toxins moduliert den Salzumsatz des Wirtsorganismus; es hilft ihm, sich an wechselnde Wasserqualitäten anzupassen und fördert damit eine weitere Verbreitung des tierischen Wirts.

Eine andere, möglicherweise nützliche Rolle für das CT könnte in der symbiontischen Beziehung zwischen *V. fischeri* und dem hawaiianischen Tintenfisch *Euprymna scolopes* (Abb. 2) bestehen, die jedoch noch genauer erforscht werden müsste. Interessanterweise besitzt auch *V. fischeri* das CTXΦ-Phagenerbgut, diesem fehlen jedoch die Gene, die das CT kodieren (RUBY et al. 2005). Ein funktionsfähiges, dem CT ähnliches Protein, das ebenfalls eine ADP-Ribosylierungsaktivität* besitzt, wurde aber an anderer Stelle des *V. fischeri*-Erbguts lokalisiert (REICH & SCHOOLNIK 1996). Noch bemerkenswerter ist, dass der Tintenfisch jeden Morgen überschüssige Bakterien ausscheidet (NYHOLM & McFALL-NGAI 2004). Es wäre nun interessant zu sehen, ob diese Ausstoßaktivität einen ähnlichen Mechanismus der Wasser- und Salzausscheidung benutzt wie das Cholera toxin. Bei anderen aquatischen Organismen wie dem Ponyfisch (*Leiognathus elongatus*) wurde gezeigt, dass der Ausstoß symbiontischer Bakterien einen Mechanismus zur Regulierung von deren Zellkonzentration darstellt (WADA et al. 2005).

Es gibt noch einen weiteren Mechanismus, der möglicherweise in der natürlichen Umgebung eine Überlastung des Wirtsorganismus verhindern könnte. Bakterien produzieren ständig kleine ‚Geruchsmoleküle‘. Im freien Wasser werden diese Moleküle weggespült, aber in einem umschlossenen

Raum können sich die Moleküle ansammeln. Wird ein bestimmter Schwellenwert von Geruchsmolekülen überschritten, schalten Bakterien in der Regel bestimmte Gene ein und manchmal auch aus. Dieses System wird „Quorum sensing“ genannt. Auch *V. cholerae* besitzt ein solches System. Hier wird es verwendet, um das CT-Gen bei erhöhter *V. cholerae* Konzentration im Darm des menschlichen Wirtes herunterzuregulieren (SANCHEZ & HOLMGREN 2008). Wäre das nicht der Fall, würden vermutlich die massiven Mengen an CT die Wirtszellen zum Absterben bringen (siehe Modell oben). Es scheint also, dass selbst im Menschen die Expression des Cholera toxins durch die Bakterienkonzentration kontrolliert wird.³ Bei *V. fischeri* wird auch die Lichtproduktion im Tintenfisch (Abb. 2) auf diese Weise reguliert. Im Wasser leuchten die Bakterien nicht, da die Geruchstoffkonzentration zu klein bleibt. In den Leuchtorganen steigt die Konzentration des bakteriellen Geruchsstoffes an. Ab einem bestimmten Schwellenwert wird über eine Kaskade von Genen schließlich die Biolumineszenz aktiviert und Licht produziert.

Ursprung des Cholera toxins

Das Hitze-labile Toxin von *E. coli* (LT) ist auf der Sequenzebene zu ca. 80% identisch mit dem CT und besitzt ebenfalls ADP-Ribosylierungsaktivität (PICKETT et al. 1989; SIXMA et al. 1993). Man könnte nun vermuten, dass LT von CT abgeleitet ist oder umgekehrt. *Vibrio cholerae* und *E. coli* kamen im Verlauf von Cholera-Epidemien im menschlichen Darm in engen Kontakt, sodass ein Gentransfer von einer Art zur anderen denkbar wäre.

Eine Möglichkeit, diese Frage zu beantworten, besteht in der Analyse des Kodongebrauchs*, denn viele Aminosäuren werden durch mehr als eine Dreier-Kombination von DNA-Bausteinen kodiert. Die Häufigkeit bei der Benutzung bestimmter Kodons zeigt, dass das LT von *E. coli* mehr optimale Kodons aus dem *V. fischeri*-Erbgut enthält als aus *E. coli* selbst (T.C. WOOD, unpublizierte Ergebnisse). Das lässt vermuten, dass das *V. fischeri*-Erbgut die ursprüngliche Quelle sowohl für CT als auch für LT sein könnte. Andererseits legt die komplizierte Interaktion der CT-tragenden genetischen Elemente mit dem *V. cholerae*-Erbgut nahe, dass die Sache vielleicht noch komplexer ist. Unser gegenwärtiges Modell, das wir für Ursprung und Funktion von CT vorschlagen, beinhaltet nachfolgende Hypothesen.

Spekulatives Modell für Ursprung und Funktion von Cholera toxin

1. CT ist ein übertragbarer Faktor (eine Art Modul), der durch Phagen in symbiontische

Vibrio-Bakterien ‚eingepflanzt‘ werden kann. Dies würde in erster Linie in Vibrionen geschehen, die es schaffen, einen umschlossenen Raum in einem Wirt (wie z.B. Eingeweide oder Leuchtorgane) zu kolonisieren. Solch ein Raum diene sowohl der Infektion durch Phagen, als auch dem Quorum sensing und damit einer *kontrollierten* Produktion von CT.

2. *Vibrios* erlangen Zugang zum Darminnern oder anderen empfänglichen inneren Organen mariner wirbelloser Tiere durch Chemotaxis* und Bindung an Chitin oder andere exponierte Makromoleküle. Die recht unspezifische, Kohlenhydrat-bindende Aktivität der *Vibrios* stellt sicher, dass sie sich an die Darmoberfläche oder an ein anderes, zur Symbiose geeignetes Organ vieler Lebewesen anheften können. CT wird in Abhängigkeit von der Zellkonzentration reguliert und ausgeschieden, sobald gewisse Umweltfaktoren gegeben sind.

3. Abhängig von dem symbiontischen Wirtstier, das von dem Bakterium bewohnt wird, unterstützt CT entweder den Salzhaushalt durch Salzausscheidung (wie z.B. in der Blaukrabbe) oder die Beibehaltung optimaler Bakterienmengen durch den täglichen Ausstoß überschüssiger Bakterien (wie z.B. im Tintenfisch oder Ponyfisch).

4. Die Menge des CT und damit dessen ‚Giftwirkung‘ wird auf genetischer Ebene durch das Ausmaß der Phagenproduktion und durch Repressoren sowie durch gewisse auslösende Umweltfaktoren wie Temperatur oder Salzkonzentration kontrolliert. Zusätzlich schaltet das Quorum sensing bei zu hoher Zelldichte der Bakterien sowohl die Produktion von TCP und CT als auch – da TCP zur Anheftung an Zellen dient – eine weitere Kolonisierung ab und verhindert dadurch sowohl Schaden am Wirtsorganismus, als auch einen *unkontrollierten* Ausstoß der Bakterien.

Trotz ihres spekulativen Charakters können uns diese Hypothesen eine Ahnung davon geben, wie ursprüngliche Funktionen des Cholera-toxins ausgesehen haben könnten. Da seine Wechselwirkung mit natürlichen tierischen Wirten in vieler Hinsicht noch unbekannt ist, könnte hier ein fruchtbares Forschungsgebiet liegen.

Cholera und der Mensch

Die Produktion von CT wird zwar durch bestimmte Umweltfaktoren kontrolliert, aber welcher Mechanismus erlaubt nun *V. cholerae* und seinem Toxin, sich im Darmtrakt *landlebender* Tiere bzw. des Menschen auszubreiten? Interessanterweise manifestiert sich Cholera selbst in den Ländern, in denen regelmäßig Cholera-Epidemien auftreten und die dauerhaft infektiöse *V. cholerae* in ihren

Küstengewässern haben, nur zu bestimmten Zeiten des Jahres. Und selbst dann verlaufen die meisten Infektionen sehr mild oder sogar ganz ohne Krankheitssymptome (KING et al. 2008). Damit die Cholera wirklich ausbricht, müssen im Allgemeinen mindestens vier wesentliche Faktoren zusammenkommen, die das Wachstum von *V. cholerae* fördern: 1) hohe Bakterienkonzentrationen in den Gewässern (krankmachende Infizierung von Menschen erfordert die Aufnahme großer Mengen an Bakterien); 2) schlechte hygienische Zustände (z.B. verunreinigtes Trinkwasser, verseuchte Nahrung, Kontakt mit Fäkalien); 3) warmes und regnerisches Wetter (durch Wärme und Einspülen von Verunreinigungen und Nährstoffen vermehren sich die Bakterien stärker), und 4) Zooplanktonblüten (an der Chitin-Oberfläche kleiner Krebstiere, die sich in ungefiltertem Flusswasser befinden, haften große Mengen an *Vibrio*-Bakterien). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass *V. cholerae*-Populationen normalerweise von weiteren, zerstörerischen Phagen mengenmäßig in Schach gehalten werden; da letztere durch Monsunregen und -fluten quasi verdünnt werden, korrelieren auch solche Wetterbedingungen mit dem Ausbruch von Cholera (FARUQUE et al. 2005).

Bevor Cholera-Bakterien also überhaupt eine Krankheit auslösen, müssen mehrere Umwelt- und menschlich-soziale Voraussetzungen gegeben sein. Diese Tatsache mag uns einen kleinen Einblick in die Mechanismen geben, die *V. cholerae* in früherer Zeit auf die aquatische Umgebung beschränkt haben.

Schlussfolgerungen

Es gibt eine Fülle von Daten, die das pathogene *V. cholerae* als einen ursprünglichen Bewohner mariner Küstenbereiche ausweisen, wo es nützliche Funktionen in Nährstoffkreisläufen hat. Diese Funktionen könnten Überbleibsel seiner ursprünglichen ökologischen Nische sein. Viele der Virulenzfaktoren von *V. cholerae* sind an ökologischen Funktionen beteiligt, welche die umweltspezifischen Rollen des Bakteriums belegen. Dies legt auch nahe, dass *V. cholerae* eigentlich besser an aquatische Umgebungen als an den menschlichen Darm angepasst ist, wo es lebensbedrohliche Durchfälle verursacht (und sich selbst und seiner Verbreitung damit nicht einmal einen Gefallen tut, da es zu rasch ausgeschieden wird). Doch im Gegensatz zu der ökologischen Rolle von *V. cholerae* spielt das CT, das primäre Toxin des Bakteriums, in der aquatischen Umgebung keine bisher bekannte Rolle. Es scheint nur im menschlichen Darm optimal freigesetzt zu werden und zu funktionieren, wo es sich in einer komplizierten Weise durch die befallenen Zellen bewegt, ohne dabei abgebaut zu werden (Abb. 3) und so Zugang zum Zellplasma erlangt, wo es dann seine Giftwirkung entfaltet (Abb. 4).

In diesem Artikel schlagen wir einige denkbare Modelle vor, wie sogar das Cholera-toxin an der ökologischen Rolle von *V. cholerae* im aquatischen Lebensraum beteiligt sein könnte und dort möglicherweise wichtige Funktionen ausübt. Einige indirekte Anhaltspunkte zeigen, dass es eine nachhaltige Beziehung zwischen *V. cholerae* und wirbellosen Tieren als Wirten fördern könnte, indem es in deren Salzregulation eingreift, wenn die Tiere Mündungsgewässer verschiedenen Salzgehalts durchqueren. Dazu kommt eventuell die Aufrechterhaltung einer bestimmten bakteriellen Zellkonzentration in symbiontischen Wirtsorganismen. Allerdings sind diese Vorschläge größtenteils spekulativ und müssen erst experimentell bestätigt werden.

Zukünftige Forschungsansätze könnten beispielsweise die Untersuchung der Stoffwechselfunktion des CT-ähnlichen Proteins in *V. fischeri* (dem Symbionten im Leuchtorgan von *Euprymna scolopes*, Abb. 2) beinhalten. Es gilt die Frage zu klären, ob dieses Protein mit dem *V. fischeri*-CTXΦ-Phagen wechselwirkt, dem die CT-Gene ja fehlen. Ein möglicher experimenteller Ansatz könnte sein, einen Stamm von *V. fischeri* zu produzieren, dem das CT-ähnliche Gen fehlt und festzustellen, ob er trotzdem in der Lage ist, eine erfolgreiche Symbiose mit dem Tintenfisch einzugehen. Ebenso von Interesse ist die Rolle – sofern es eine gibt –, die CT von *V. cholerae* im Verdauungssystem von wirbellosen Mündungsgebiet-Bewohnern wie der Blaukrabbe (Abb. 5) spielen könnte. Man könnte untersuchen, ob *V. cholerae*-Stämme, denen CTXΦ fehlt, in der Lage sind, den Darmtrakt von Wirbellosen zu besiedeln bzw. deren Einfluss auf die Salzregulation ihrer Wirte feststellen. Den meisten der ca. 140 unterscheidbaren *V. cholerae*-Stämme fehlt das Erbgut des CTXΦ-Phagen und damit CT. Sie wären daher ideale Testkandidaten für einen Vergleich mit CT-tragenden Stämmen. Auf diese Weise könnte man einer möglichen Funktion von CT in einer symbiontischen Lebensbeziehung ein wenig näher kommen.

Unsere Studie zeigt am Beispiel der Cholera, dass potenzielle Krankheitserreger (inklusive ihrer Toxine) in ihrer ursprünglichen ökologischen Nische nützliche Funktionen als Mitbewohner oder Symbionten gehabt haben mögen, nun aber, da sie in neuen Nischen auftauchen, plötzlich Krankheiten verursachen. Es scheint, dass Cholera-toxin im menschlichen Darm am falschen Platz ist, aber dass es in den Eingeweiden von Wirbellosen am richtigen Platz sein könnte. Die Hauptargumente dafür sind, dass (i) Cholera-bakterien überall auf der Welt vorkommen, aber nur an einigen wenigen Orten Cholera verursachen, (ii) eine hohe Dosis an Bakterien notwendig ist, um Cholera auszulösen, und (iii) hohe Konzentrationen von Cholera-bakterien durch kontrollierende Faktoren wie Temperatur und Phagen in Schach gehalten werden. Natür-

lich wäre es auch möglich, dass das Cholera-toxin, wie wir es kennen, mutiert ist und erst dadurch pathogen wurde, aber hierzu gibt es, soweit wir wissen, keine Untersuchungen. Unsere Vermutung, dass Pathogene und ihre zugehörigen Virulenzfaktoren möglicherweise nur sehr geringe Veränderungen benötigen, um als Krankheitserreger aufzutreten, bedarf daher noch umfangreicher Forschung.

In jüngster Zeit befasst man sich auch unter einer naturalistischen Denkweise zunehmend mit biochemischen Phänomenen, die ‚Sinn machen‘. Prozesse werden gar nicht mehr unbedingt als ‚Kampf ums Dasein‘ interpretiert, sondern im größeren Zusammenhang der vielfältigen Wechselbeziehungen der Organismen in ihrer natürlichen Umgebung gesehen (MLOT 2009).

übersetzt und bearbeitet von
Judith Fehrer und Niko Winkler

Anmerkungen

- ¹ Allerdings zeigen einige Studien, dass das CT die tiefer gelegenen Darmschleimhautzellen (in den Darmkrypten) gar nicht erreicht, sondern stattdessen möglicherweise direkt den Darm umgebende Nervenzellen aktiviert, die dann Signale für die massiven Wasserausscheidungen geben (LUNDGREN 2002).
- ² Warum es in der Blaukrabbe harmlos ist, ist unklar. Es könnte sein, dass die Freisetzung des Toxins in dieser Umgebung stark kontrolliert wird.
- ³ Ob dies einer der Gründe dafür ist, dass die meisten Infektionen milde oder sogar symptomlos verlaufen (KING et al. 2008), ist leider bisher nicht erforscht.

Literatur

- BLANK N, SCHILLER M, KRIENKE S, WABNITZ G, HO AD & LORENZ HM (2007) Cholera toxin binds to lipid rafts but has limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol. Cell. Biol.* 85, 378-382.
- BOYD EF, MOYER KE, SHI L & WALDOR MK (2000) Infectious CTXΦ and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect. Immun.* 68, 1507-1513.
- COLWELL RR, WEST PA, MANEVAL D, REMMERS EF, ELLIOTT EL & CARLSON NE (1984) Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. *In* COLWELL RR (ed) *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York, S. 367-387.
- COLWELL RR (2006) A global and historical perspective of the genus *Vibrio*. *In* THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J (Hg) *The Biology of the Vibrios*. ASM Press, Washington D.C., S. 3-11.
- DAVIS BM, LAWSON EH, SANDKVIST M, ALI A, SOZHAMANNAN S & WALDOR MK (2000) Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXΦ. *Science* 288, 333-335.
- DE HAAN L & HIRST TR (2004) Cholera toxin: a paradigm for multifunctional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 21, 77-92.

- EHRlich GD, HILLER NL & HU FZ (2008) What makes pathogens pathogenic. *Genome Biol.* 9(6), 225.
- FARUQUE SM, NASER IB, ISLAM MJ, FARUQUE ASG, GHOSH AN, NAIR GB, SACK DA & MEKALANOS JJ (2005) Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1702-1707.
- FARUQUE SM, KAMRUZZAMAN M, ASADULGHANI, SACK DA, MEKALANOS JJ & BALAKRISHN NAIR G (2003) CTXΦ-independent production of the RS1 satellite phage by *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1280-1285.
- FARUQUE SM & NAIR GB (2006) Epidemiology. In THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J (Hg) *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C., S. 385-398.
- FRANCIS JW (2006) The role of virulence factors in the establishment of beneficial ecological relationships of *Vibrio cholerae* and *Vibrio fischeri*. *Occasional Papers of the BSG* 8, 14-15.
- FRANCIS JW (2009) Good designs gone bad. *Answers Magazine* 4, 32-35.
- FULLNER KJ & MEKALANOS JJ (1999) Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 67, 1393-1404.
- HIRST TR (1999) Cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. In ALOUF JE & POPOFF MR (Hg) *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, Burlington, MA, S. 104-129.
- HUO A, HUO SA, GRIMES DJ, O'BRIEN M, CHU KH, CAPUZZO JM & COLWELL RR (1986) Colonization of the gut of the Blue Crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microb.* 52, 586-588.
- KING AA, IONIDES EL, PASCUAL M & BOUMA MJ (2008) Inapparent infections and cholera dynamics. *Nature* 454, 877-880.
- KIRN TJ, JUDE BA & TAYLOR RK (2005) A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* 438, 863-866.
- KUZIEMKO GM, STROH M & STEVENS RC (1996) Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 35, 6375-6384.
- LUNDGREN O (2002) Enteric nerves and diarrhea. *Pharmacol. Toxicol.* 90, 109-120.
- MASIGNANI V, PIZZA M & RAPPULI R (2000) Common features of ADP-Ribosyltransferases. In BORN GVR, GANTEN D, HERKEN H, STARKE K & TAYLOR P (Hg) *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 145. Springer, Berlin, S. 21-44.
- MATSON JS, WITHEY JH & DiRITA VJ (2007) Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 75, 5542-5549.
- MEIBOM KL, LI XB, NIELSEN AT, WU C-Y, ROSEMAN S & SCHOOLNIK GK (2004) The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2524-2529.
- MEIBOM KL, BLOKESCH M, DOLGANOV NA, WU C-Y & SCHOOLNIK GK (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824-1827.
- MILLER JF (2003) Bacteriophage and the evolution of epidemic cholera. *Infect. Immun.* 71, 2981-2982.
- MLOT (2009) Antibiotics in nature: beyond biological warfare. *Science* 324, 1637-1639.
- MORAN NA (2004) Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108, 583-586.
- NALIN DR, DAYA V, REID A, LEVINE MM & CISNEROS L (1979) Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.* 25, 768-770.
- NYHOLM SV & McFALL-NGAI MJ (2004) The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 632-642.
- OWENS L & BUSICO-SALCEDO N (2006) *Vibrio harveyi*: pretty problems in paradise. In THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J (Hg) *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C., S. 266-280.
- PATTON WA, VITALE N, MOSS J & VAUGHAN M (2000) Mechanism of cholera toxin action: ADP-ribosylation factors as stimulators of cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation and effectors in intracellular vesicular trafficking events. In BORN GVR, GANTEN D, HERKEN H, STARKE K & TAYLOR P (Hg) *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 145. Springer, Berlin, S. 133-165.
- PICKETT CL, TWIDDY EM, COKER C & HOLMES RK (1989) Cloning, nucleotide sequence, and hybridization studies of the type IIb heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 4945-4952.
- PRUZZO C, VEZZULLI L & COLWELL RR (2008) Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 10, 1400-1410.
- REGUERA G & KOLTER R (2005) Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 187, 3551-3555.
- REICH KA & SCHOOLNIK GK (1996) Halovibrin, secreted from the light organ symbiont *Vibrio fischeri*, is a member of a new class of ADP-ribosyltransferases. *J. Bacteriol.* 178, 209-215.
- REIDL J & KLOSE KE (2002) *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 2, 125-139.
- RUBY EG, URBANOWSKI M, CAMPBELL J, DUNN A, FAINI M, GUN-SALUS R, LOSTROH P, LUPP C, McCANN J, MILLIKAN D, SCHAEFER A, STABB E, STEVENS A, VISICK K, WHISTLER C & GREENBERG EP (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3004-3009.
- SANCHEZ J & HOLMGREN J (2008) Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65, 1347-1360.
- SIXMA TK, KALK KH, VAN ZANTEN BAM, DAUTER Z, KINGMA J, WITHOLT B & HOL WG (1993) Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* 230, 890-918.
- THOMPSON JR & POLZ MF (2006) Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. In THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J (Hg) *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C., S. 190-203.
- URAKAWA H & RIVERA ING (2006) Aquatic environment. In THOMPSON FL, AUSTIN B & SWINGS J (Hg) *The Biology of Vibrios*. ASM Press, Washington D.C., S. 175-189.
- VANDEN BROECK D, HORVATH C & DE WOLF MJS (2007) *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1771-1775.
- WADA M, BARBARA GM, MIZUNO N, AZUMA N, KOGURE K & SUZUKI Y (2005) Expulsion of symbiotic luminous bacteria from pony fish, *Leiognathus nuchalis*. In TSUJI A, MATSUMOTO M, MAEDA M, KRICKA LJ & STANLEY PE (Hg) *Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress and Perspectives*. World Scientific Publishers, Singapore, S. 99-102.
- WALDOR MK & MEKALANOS JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272, 1910-1914.
- ZHU J, MILLER MB, VANCE RE, DZIEJMAN M, BASSLER BL & MEKALANOS JJ (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3129-3134.
- ZIMMER C (2008) *Microcosm: E. coli and the new science of life*. Pantheon, New York.