

The Genomic Content of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in Freshwater Cyanobacteria

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Claudia Maria Taubenheim, geb. Walda
Kiel, im Juli 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tal Dagan

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ruth Schmitz-Streit

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2019

1 Abstract

Outer membrane vesicles (OMVs) are secreted by many bacterial species, where they are involved in diverse extracellular functions as well as intercellular communication. They contain DNA which has been reported to be a source for lateral gene transfer at a similar efficiency as transduction. However, it is only poorly understood what the natural genetic content of OMVs comprise and how it changes with different environmental conditions. Here, I searched for the existence of OMVs in several cyanobacteria and studied their genomic content. Additionally, I assessed OMVs abundance and genomic content in the unicellular *Synechocystis* sp. PCC 6803 under various environmental conditions.

I isolated vesicles from stationary growth cultures. Transmission electron microscopy showed OMVs in *Synechocystis* sp. PCC 6803, as well as in the filamentous *Anabaena* sp. PCC 7120 and *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 as discrete, spherical blebs having a bilayer membrane with a diameter ranging between 20 and 150 nm. Some of the isolated OMVs contained DNA and sequencing revealed the presence of most of the genome including the chromosome and plasmids (if existing) in all three cyanobacteria. Additionally, a temperate phage was identified in *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 via TEM and sequencing.

For *Synechocystis* sp. PCC 6803, I found that the OMV abundance is significantly higher in bacteria cultured under heat- or high salt- stress in comparison to the control conditions. Sequencing revealed that two small cryptic plasmids – pCA2.4 and pCB2.4 – were highly overrepresented in the vesicle DNA independent of the growth conditions compared to a genomic DNA sample. I additionally identified overrepresented genes dependent on the growth condition in vesicles.

I hypothesize that the enrichment for small plasmids in the vesicles is a stochastic process and a result of their high abundance in the cell, their packed topology, high diffusibility, and location. Further, I speculate that various mechanisms involved in cell cycle, transcription, or gene amplification might increase the likelihood of specific sequences to be packed in vesicles. My observations implicate that OMVs are a transfer mechanism of small plasmids by providing a nuclease protected DNA space and may serve as a mechanism to maintain plasmids and/or important genes for the population.

2 Zusammenfassung

Viele Bakterien produzieren sogenannte "Outer membrane Vesicles (OMVs)"- äußere Membranvesikel. Diese sind an diversen extrazellulären Funktionen und der interzellulären Kommunikation beteiligt. Sie können DNA enthalten und frühere Studien zeigten, dass sie lateralen Gentransfer mit einer Effizienz vergleichbar zur Transduktion ermöglichen können. Es ist allerdings nur wenig bekannt, was der natürliche genomische Inhalt der Vesikel ist und wie sich dieser unter verschiedenen Bedingungen ändert. In dieser Arbeit untersuchte ich die Existenz der OMVs und deren DNA Gehalt in verschiedenen Cyanobakterienspezies. Zusätzlich quantifizierte ich OMVs und analysierte Vesikel-DNA in verschiedenen Wachstumsbedingungen in dem unizellulären *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Die Vesikel isolierte ich aus Kulturen in der stationären Wachstumsphase. Transmissionselektronenmikroskopie zeigte die Existenz von OMVs sowohl in *Synechocystis* sp. PCC 6803 als auch in den filamentösen Spezies *Anabaena* sp. PCC 7120 und *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912. Die OMVs zeigten sich als diskrete, runde Entitäten mit einer doppelschichtigen Membran und einem Durchmesser zwischen 20 und 150 nm. Die Sequenzierung des vesikulären Inhalts offenbarte die Existenz von DNA innerhalb der Vesikel, wobei fast das gesamte Chromosom und die Plasmide (sofern in der Spezies vorhanden) in allen drei Cyanobakterien identifiziert werden konnte. Außerdem identifizierte ich einen temperenten Phagen in *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 mittels TEM und Sequenzierung.

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 stellte ich im Vergleich zu Kontrollbedingungen, signifikant höhere OMV Mengen in mit Salz- bzw. Hitzestress behandelten Bakterienkulturen fest. Die Sequenzierung der Proben zeigte eine starke Überrepräsentation der zwei kleinen Plasmide pCA2.4 und pCB2.4 im Vergleich zur genomischen DNA und unabhängig von der jeweiligen Wachstumsbedingung. Zusätzlich identifizierte ich überrepräsentierte Gene, abhängig von den jeweiligen Wachstumsbedingungen.

Ich stelle die Hypothese auf, dass die Anreicherung der kleinen Plasmide in den Vesikeln ein stochastischer Prozess ist, der durch ihre hohe Anzahl in der Zelle, ihrer komprimierten Topologie, ihrem hohen Diffusionsvermögen und ihrer zellulären Lokalisation bedingt wird. Weiterhin spekuliere ich, dass verschiedene Mechanismen des Zellzyklusses, der Transkription oder Genamplifikation die Wahrscheinlichkeit erhöhen könnten, dass spezifische DNA Sequenzen in OMVs akkumulieren. Meine Beobachtungen implizieren, dass OMVs einen Transfermechanismus für kleine Plasmide und DNA Fragmente darstellen könnten, indem sie einen Nuklease-geschützten Raum schaffen, der für die Erhaltung der Plasmide und wichtiger Gene in der Population dient.