

Zell-Zell-Interaktionen

Verständnis der mikrobiellen Interaktionen beim Abbau von Polysacchariden

GLEN D'SOUZA

INSTITUTE OF BIOGEOCHEMISTRY AND POLLUTANT DYNAMICS, DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SYSTEMS SCIENCE, ETH ZÜRICH, SCHWEIZ

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, EAWAG: SWISS FEDERAL INSTITUTE OF AQUATIC SCIENCE AND TECHNOLOGY, DÜBENDORF, SCHWEIZ

Polysaccharides are the dominant stocks of bioavailable carbon on the planet. While much progress has been made in understanding the enzymatic mechanisms of polysaccharide breakdown by microbes, the role of cell-cell interactions in enabling microbes to breakdown complex polysaccharides is less understood. Leveraging microfluidics coupled to automated microscopy allows an understanding the role of cell-cell interactions in polysaccharide degradation by microbes.

DOI: 10.1007/s12268-024-2230-x
© Der Autor 2024

■ Polysaccharide sind in allen Ökosystemen auf unserem Planeten die vorherrschenden Vorräte an organischem Kohlenstoff [1]. In der Meeresumwelt beispielsweise werden Polysaccharide durch die Stoffwechselaktivitäten von Phytoplanktonzellen produziert.

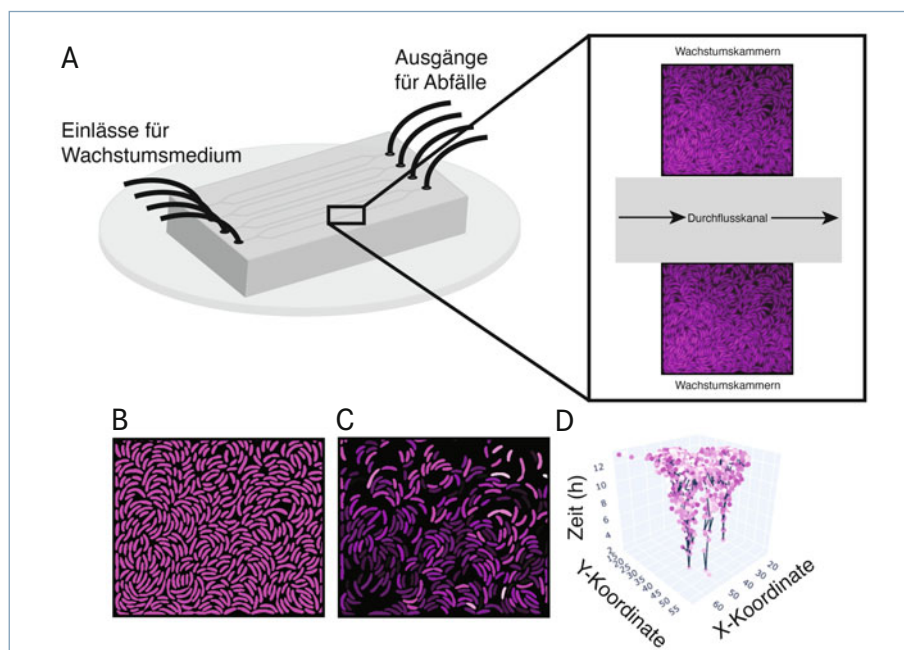
Diese Polysaccharide werden wiederum von mikrobiellen Gemeinschaften abgebaut, die die Abbauprodukte zur Gewinnung von Energie für ihr Wachstum nutzen. Der Abbau von Polysacchariden durch mikrobielle Zellen hat Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit sowie auf die Ausbreitung biogeochemischer Kreisläufe, die für die Gesundheit des Planeten von entscheidender Bedeutung sind – ein Prozess, der für die Aufrechterhaltung der Gesundheit und des Gleichgewichts unseres Planeten unerlässlich ist [1].

Mikrobielle Zellen bauen Polysaccharide durch den Einsatz einer Vielzahl von Enzymen ab [2]. Jüngste Fortschritte in der biochemischen Forschung haben die enzymatische Taktik der Mikroorganismen beim Abbau dieser komplexen Zucker erhellt. Oft wirken mehrere Enzyme zusammen, um Polysaccharide in einfachere, leichter zugängliche Formen zu zerlegen. Dieser enzymatische Abbau ist auch deshalb so wichtig, weil er die Umwandlung von Polysacchariden in Verbindungen ermöglicht, die von anderen Mikro- und Makroorganismen genutzt werden können, die Polysaccharide nicht abbauen können [3, 4].

Während viel darüber bekannt ist, welche Enzyme von welchen Mikrobenarten produziert werden, ist wenig über den Einfluss ökologischer Interaktionen zwischen mikrobiellen Zellen, insbesondere Zell-Zell-Interaktionen, auf den Abbau dieser Polysaccharide erforscht. Eine Idee, die vorgeschlagen wurde, ist, dass Interaktionen die Effizienz des Polysaccharidabbaus erheblich verstärken könnten, aber die komplizierten Details bleiben schwer fassbar [5–7]. Solche Wissenslücken bestehen, weil das Verständnis von Zell-Zell-Interaktionen Messungen von Wachstum und Verhalten auf der Ebene einzelner Zellen in Gemeinschaften erfordert.

Mikrofluidik gekoppelt mit Zeitraffermikroskopie zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen

Fortschritte bei den Technologien zur Kopplung von Mikrofluidik und automatisierter



▲ **Abb. 1:** Überblick über Mikrofluidik gekoppelt mit automatisierter Zeitraffermikroskopie und Einzelzellanalyse. **A**, Zellen wachsen in einem mikrofluidischen Wachstumsgerät und ein automatisiertes Mikroskop bildet die Entwicklung von Gemeinschaften mit hoher zeitlicher Auflösung ab. Die Bilder werden mithilfe von **(B)** Segmentierung und Verfolgung analysiert und **(C)** Wachstumsraten und **(D)** Abstammung einzelner Zellen in einer Gemeinschaft werden berechnet. Angepasst von [3].

Mikroskopie haben die Untersuchung interzellulärer Interaktionen in mikrobiellen Gemeinschaften auf der Mikroskala ermöglicht [8, 9]. Mikrofluidische Wachstumsgeräte bestehen in der Regel aus einem inerten Polymer – Polydimethylsiloxan (PDMS) – das an ein Deckglas gebunden ist (**Abb. 1A**). In die PDMS-Schicht sind mehrere Wachstumskanäle geätzt. Jeder dieser Wachstumskanäle besteht aus einem Einlass, durch den Wachstumsmedium mit Nährstoffen gepumpt werden kann. Dieses Medium gelangt in Strömungskanäle (ungefähre Höhe: 20 μm und ungefähre Breite: 100 μm), an deren Seiten sich mehrere Wachstumskammern befinden. Die Abmessungen jeder Wachstumskammer (ungefähre Höhe: 0,85 μm , ungefähre Länge: 60 μm , ungefähre Breite: 90 bis 120 μm) ermöglichen es den einzelnen Zellen, sich frei zu bewegen oder an dem Glasdeckglas anzuhängen, das den Boden der Wachstumskammer bildet, während das PDMS die Decke darstellt. Die Zellen wachsen als Monolayer, da die Höhe der Kammer weniger als ein Mikrometer beträgt, also weniger als die Breite einer einzelnen Zelle.

Nährstoffe, einschließlich des als Kohlenstoffquelle verwendeten Polysaccharids, werden ständig durch den Strömungskanal gepumpt und gelangen in die Wachstumskammern, hauptsächlich durch Diffusion. Die Anzahl der Zellen und ihre Positionierung in den mikrofluidischen Kammern werden durch die Wachstumsrate der Zellen sowie durch die Zellbewegung bestimmt. Durch die Kombination von Mikrofluidik mit automatisierter Zeitraffermikroskopie ist es möglich, die Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften über die Zeit abzubilden (**Abb. 1A**). Das Wachstum und die räumlichen Muster der Zellen können durch die Analyse der Zeitrafferfilme mittels Bildanalyse quantifiziert werden.

Für die quantitative Analyse werden Bildverarbeitungsalgorithmen auf Zeitrafferfilme angewendet. Der erste Schritt besteht in der Zellsegmentierung. Bei diesem Verfahren werden die Zellgrenzen in jedem Bild abgegrenzt, um einzelne mikrobielle Zellen zu identifizieren (**Abb. 1B**). Hierfür werden auf maschinellem Lernen und tiefen neuronalen Netzen basierende Methoden eingesetzt, um die Zellen vom Hintergrund zu unterscheiden, wobei die Parameter so angepasst werden, dass die variable Intensität und Form der mikrobiellen Zellen berücksichtigt wird. Im Anschluss an die Segmentierung werden die segmentierten Zellen durch Tracking

über aufeinanderfolgende Bilder hinweg miteinander verbunden. Dieses Tracking wird durch die Verknüpfung der identifizierten Positionen der Zellen in einem Bild mit ihren nachfolgenden Positionen im nächsten Bild erreicht, wobei sowohl ihre Bewegung als auch morphologische Veränderungen berücksichtigt werden. Durch die Aufrechterhaltung der Kontinuität der Zellidentitäten durch ihre physischen Trajektorien und morphologische Stabilität werden die zeitlichen Profile für jede Zelle erstellt.

Um die Abstammungslinien der Zellen innerhalb der Mikrofluidikkammern abzugrenzen, werden jeder ursprünglichen Zelle eindeutige Kennungen zugewiesen. Wenn sich eine Zelle teilt, erben ihre Nachkommen eine modifizierte Version dieser Kennung, wobei die Verbindung zur Mutterzelle erhalten bleibt. Dieser Ansatz ermöglicht die Rückverfolgung der Abstammung einer beliebigen Zelle bis zu ihrem ursprünglichen Vorläufer in der Kammer (**Abb. 1D**). Die Bildverarbeitungsalgorithmen analysieren diese Stammbäume, um mehrere Schlüsselparameter für jede Zelle zu quantifizieren:

1. Die Zeit zwischen den Teilungen, d. h. die Zeit, die zwischen aufeinanderfolgenden Teilungen verstreicht.
2. Die Wachstumsrate, die durch Bewertung der Zunahme der Zellgröße zwischen den Teilungsereignissen bestimmt wird (**Abb. 1C**).
3. Die räumliche Positionierung der Nachkommenschaft nach der Teilung, die bevorzugte Wachstumsmuster oder Ver-

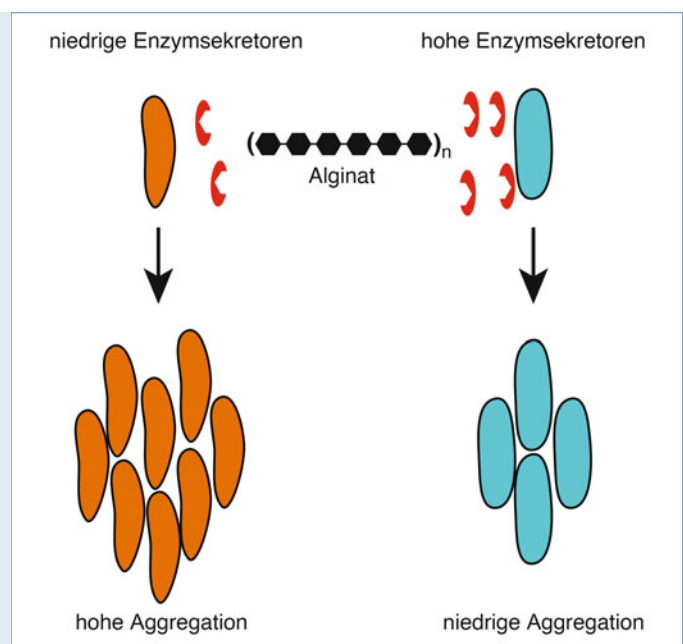
zerrungen in der räumlichen Verteilung aufgrund lokaler Umweltbedingungen oder Zell-Zell-Interaktionen aufzeigen kann (**Abb. 1D**).

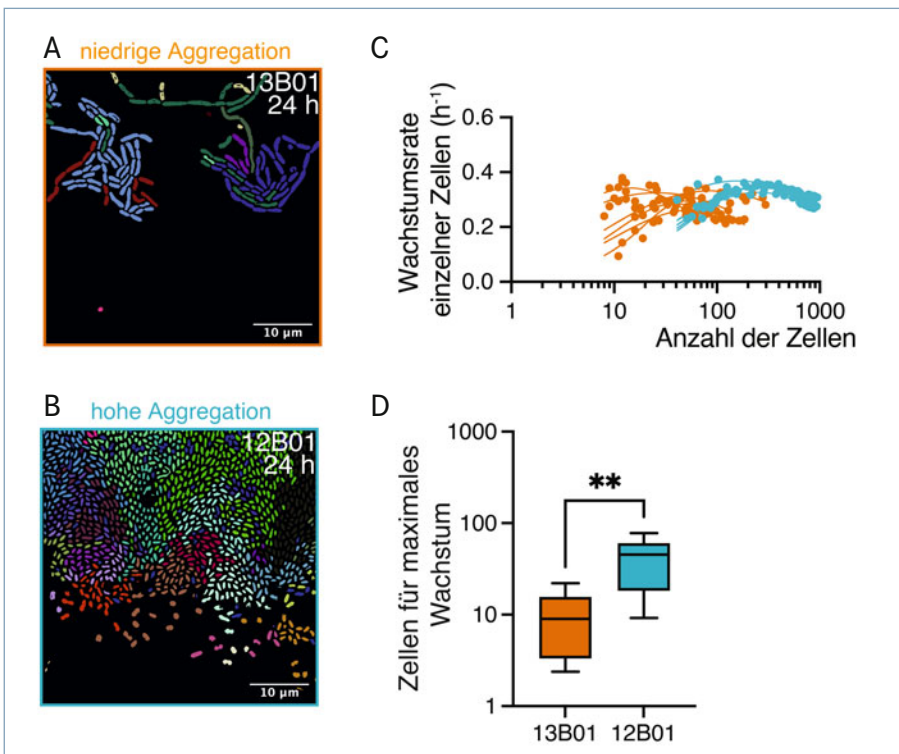
Durch die Analyse dieser Parameter ist es möglich, die zellulären Strategien für die Ressourcennutzung in der Wachstumskammer zu ermitteln. Die Abstammungskarten ermöglichen auch die Untersuchung der Populationsdynamik, z. B. ob bestimmte Abstammungslinien die Gemeinschaftsstruktur im Laufe der Zeit dominieren oder ob es eine gleichmäßige Verteilung der Ressourcen unter den Zellen gibt. Durch die Ausweitung dieser Analyse auf eine große Zellpopulation in mehreren Wachstumskammern ist es möglich, statistische Analysen durchzuführen, um die Variabilität und Konsistenz dieser Parameter innerhalb und zwischen mikrobiellen Gemeinschaften zu verstehen. Dies ermöglicht einen ganzheitlichen Blick auf die Dynamik der Gemeinschaft, die beim Polysaccharidabbau eine Rolle spielt.

Zellen setzen unterschiedliche Strategien zum Abbau von Polysacchariden ein

Bakterien wenden zwei gängige Strategien für den Abbau von Polysacchariden an. Die erste, oft als „egoistische“ Strategie bezeichnet [6], beinhaltet den Einsatz periplasmatischer Enzyme zur Hydrolyse von Polysacchariden, wodurch sichergestellt wird, dass der Großteil der Hydrolyseprodukte in der Zelle verbleibt und der Verlust an die extrazelluläre Umgebung minimiert wird (**Abb. 2**).

► Stämme, die geringe Mengen an Alginat abbauenden Enzymen produzieren (rote Objekte), wachsen stärker als Aggregate, während Zellen, die hohe Mengen an Enzymen absondern, eher als kleinere Aggregate wachsen.





▲ **Abb. 3:** Wachstumsdynamik von niedrig und hoch aggregierenden Stämmen auf Alginat. **A, B,** Bilder von niedrig und hoch aggregierenden Stämmen nach 24 h Wachstum. Die Zellen sind entsprechend ihrer Familienzugehörigkeit eingefärbt. **C,** Die Wachstumsraten der Zellen sind abhängig von der Anzahl der Zellen in einer Wachstumskammer: von der Größe der Aggregate. Jede Linie stellt die mittleren Wachstumsraten aller Zellen in einer Kammer zu verschiedenen Zeitpunkten dar. **D,** Zellen von stark aggregierenden Stämmen wie *Vibrio splendidus* 12B01 benötigen eine höhere Anzahl von Zellen, um schnell zu wachsen, als Zellen von gering aggregierenden *Vibrio splendidus* 13B01-Stämmen (nach [6]). Die Boxplots zeigen die Verteilungen der Anzahl der Zellen zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate, und die Whiskers zeigen die Quantile der Verteilung an. Die Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (Mann-Whitney-Tests, $p < 0,008$).

Bei der zweiten Strategie bauen die Bakterien Polysaccharide mithilfe von Enzymen ab, die entweder an die Zelloberfläche gebunden sind oder in die Umwelt abgegeben werden (**Abb. 2**). Bei diesem Ansatz entsteht ein Pool von Hydrolyseprodukten mit niedrigem Molekulargewicht, die als öffentliche Güter fungieren und sich frei verbreiten können. Diese öffentlichen Güter können das Wachstum und den Stoffwechsel benachbarter Zellen beeinflussen oder von ihrem Ursprungsort wegdiffundieren [6].

Selbst bei eng verwandten Bakterienstämmen lassen sich Unterschiede in der Verwertung komplexer Polysaccharide beobachten, die sich in ihrem unterschiedlichen Enzymrepertoire und molekularen Mechanismen widerspiegeln. So weisen beispielsweise marine Stämme aus der Familie der Vibrionaceae eine Vielfalt bei der Sekretion von Alginat-Lyasen auf, die Alginat abbauen – ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid, das aus abwechselnden Blöcken von Gulu-

ron- und Mannuronsäure besteht. Ein bemerkenswertes Beispiel sind die unterschiedlichen Ansätze der beiden *Vibrio splendidus*-Stämme 13B01 und 12B01 [7]. Der Stamm 13B01 sondert große Mengen an Alginatlyasen ab und trägt damit zu einem gemeinsamen Pool von Abbauprodukten bei. Im Gegensatz dazu setzt 12B01 geringere Mengen dieser Enzyme frei, was wahrscheinlich auf die membrangebundene Natur seiner Lyasen zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Sekretionsmengen von Alginat-Lyasen bei Vibrionaceae-Stämmen die Wachstumsdynamik ihrer Populationen beeinflussen, insbesondere in gut gemischten Umgebungen.

Zellen aggregieren beim Wachstum auf Polysacchariden

Das Zusammenspiel zwischen der Diffusionsdynamik von Hydrolyseprodukten und der lokalen Zelldichte ist entscheidend dafür, dass Bakterien die Nebenprodukte des Polysaccharidabbaus effektiv verwerten können

[6, 9]. Um diffusionsbedingten Verlusten entgegenzuwirken, zeigen Bakterien häufig ein Aggregationsverhalten, das nicht nur die lokale Dichte, sondern auch die Aufnahme dieser Produkte durch die Produktionszellen erhöht. Diese kollektive Strategie ist für das Wachstum klonaler Populationen von Vorteil, da sie die abbauenden Maßnahmen benachbarter Zellen nutzt.

Gleichzeitig ist die Entwicklung von Ausbreitung und kollektivem Verhalten wie Aggregation miteinander verflochten und wirkt sich auf das Ausmaß der Zusammenarbeit innerhalb einer Population aus. Mobilitätsunterschiede sind besonders einflussreich; weniger mobile Individuen neigen dazu, mehr zu kooperieren, wenn die Aggregationskosten hoch sind. Obwohl die Aggregation denjenigen hilft, die eine hohe Dichte benötigen, kann eine größere Streuung für Individuen, die bedeutende öffentliche Güter produzieren, von Vorteil sein. So können sie die Ausbeutung durch nicht-produzierende

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer

Verbraucherzellen vermeiden und die Vorteile der Zusammenarbeit in hoher Dichte gegen das Risiko einer Invasion durch Trittbrettfahrer abwägen.

Die Enzymproduktion hängt mit der Stärke der Interaktionen und der Aggregation zusammen

Die Untersuchung der Dynamik verschiedener Stämme mariner Vibrionaceae-Bakterien, die das marine Polysaccharid Alginate abbauen und sich auch in der Produktion der Gesamtmenge an Alginate abbauenden Enzymen – Alginatlyasen – unterscheiden, ergab, dass Unterschiede in der Sekretion von Polysaccharid abbauenden Enzymen zwischen den Stämmen mit Unterschieden im Aggregationsverhalten verbunden sind [6]. Stämme, die eine geringe extrazelluläre Sekretion von Alginatlyasen aufweisen, aggregieren stärker als Stämme, die hohe Mengen an Enzymen absondern (**Abb. 2**).

Die Bildung von Aggregaten durch Stämme, insbesondere durch solche, die sehr geringe Mengen an Alginatlyasen produzieren, ermöglicht diesen Stämmen, ihre Zelldichte zu erhöhen. Die erhöhte Dichte ermöglicht es den Zellen, von den Abbauaktivitäten der anderen zu profitieren, und fördert somit die interzelluläre Zusammenarbeit zwischen den Zellen, die die Aggregate bilden (**Abb. 3**). Diese Ergebnisse wurden durch eine mathematische Modellierung gestützt, die ergab, dass der Gehalt an Abbauenzymen, die von den Zellen ausgeschieden werden, ein wichtiger Parameter für die Einstellung der Wahrscheinlichkeit ist, dass die Zellen miteinander konkurrieren oder kooperieren.

Ausblick

Die genetischen und molekularen Mechanismen, die Enzymsekretion, Aggregation und

Zell-Zell-Interaktionen in marinen Vibrionaceae-Bakterien verbinden, sind noch unbekannt. Dennoch ist es offensichtlich, dass die Analyse des Zellwachstums und -verhaltens auf der Basis von Einzelzellen ein bedeutendes Licht auf die komplexen Wachstumsstrategien von mikrobiellen Gemeinschaften wirft. Solche Einblicke offenbaren das Zusammenspiel von Konkurrenz und Kooperation, das für das Überleben und die Vermehrung dieser Organismen von grundlegender Bedeutung ist. Die Erkenntnisse aus diesem Verhalten haben weiterreichende Auswirkungen auf die biogeochemischen Kreisläufe, die das Leben auf der Erde erhalten und den Umsatz von Nährstoffen und den Energiefluss in marinen Ökosystemen beeinflussen. Das Verständnis dieser Prozesse auf mikrobieller Ebene ist für die Entwicklung eines Verständnisses des Einflusses von Mikroorganismen auf die globale Gesundheit des Planeten unerlässlich. ■

Literatur

- [1] Grondin JM, Tamura K, Déjean G et al. (2017) Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *J Bacteriol* 199: e00860-16
- [2] Hehemann J-H, Arevalo P, Datta MS et al. (2016) Adaptive radiation by waves of gene transfer leads to fine-scale resource partitioning in marine microbes. *Nat Commun* 7: 12860.
- [3] D'Souza G, Schwartzmann J, Keegstra J et al. (2023) Interspecies interactions determine growth dynamics of biopolymer-degrading populations in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 120: e2305198120

- [4] Amarnath K, Narla AV, Pontrelli S et al. (2023) Stress-induced metabolic exchanges between complementary bacterial types under a dynamic mechanism of inter-species stress resistance. *Nat Commun* 14: 3165
- [5] Allison SD (2005) Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecol Lett* 8: 626-635
- [6] D'Souza G, Ebrahimi A, Stubbsch A et al. (2023) Cell aggregation is associated with enzyme secretion strategies in marine polysaccharide-degrading bacteria. *ISME J* 17: 703-711
- [7] Ebrahimi A, Schwartzman J, Cordero OX (2019) Multicellular behaviour enables cooperation in microbial cell aggregates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374: 20190077
- [8] Dal Co A, van Vliet S, Kiviet DJ et al. (2020) Short-range interactions govern the dynamics and functions of microbial communities. *Nat Ecol Evol* 4: 366-375
- [9] D'Souza G, Povolov VR, Keegstra JM et al. (2021) Nutrient complexity triggers transitions between solitary and colonial growth in bacterial populations. *ISME J* 15: 2614-2626

Funding note: Open Access funding provided by Lib4RI – Library for the Research Institutes within the ETH Domain: Eawag, Empa, PSI & WSL.
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. Glen D'Souza
 Eawag
 Überlandstrasse 133
 CH-8600 Dübendorf
 glengeralddsouza@gmail.com

AUTOR



Glen D'Souza

Jahrgang 1989. 2009–2011 Mikrobiologiestudium, Universität Mumbai, Indien. 2016 Promotion in Mikrobiologie, Universität Jena und Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena. Seit 2016 PostDoc, ETH Fellow, ETH Zürich, Schweiz.