

Strategien des Lebenszyklus

Sporenbildung bei *Bacillus subtilis*: Masse oder Klasse?

ILKA BISCHOFFS

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRICHE MIKROBIOLOGIE, MARBURG,
BIOQUANT UND ZENTRUM FÜR MOLEKULARE BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Recent timelapse microscopy studies suggest that endospore forming bacteria encounter a quantity-quality tradeoff: *Bacillus subtilis* can either make more or better spores. Natural isolates employ different life-cycle strategies that are beneficial under different revival conditions. These findings have implications for our understanding of the ecology and evolution of sporulating bacteria and their use in biotechnological applications.

DOI: 10.1007/s12268-020-1456-5
© Die Autorin 2020

Die bakterielle Endospore ist eine faszinierende Überdauerungsform: Nur Mikrometer klein, schützt sie das Genom im Sporenkern. Sie überdauert Hitze, Trockenheit und Nahrungsmangel – bis die Umweltbedingungen wieder geeignet sind. Dann keimt die Spore innerhalb von Minuten, und eine neue, vermehrungsfähige Zelle wächst aus ihr heraus.

Ob eine Spore aus dem All das Leben auf unseren Planeten brachte, ist umstritten. Tatsache ist, dass Sporen den Weg in fast jede irdische Nische gefunden haben. Sie sind

allgegenwärtig und ihre Bekämpfung gehört in Bereichen mit hohen Hygieneanforderungen zum Alltag. Auch ihre biotechnologische Nutzung als Vehikel für Impfungen, als Teil selbstreparierender Baustoffe, als biologisches Speichermedium zur Herkunftsnachverfolgung von Objekten oder ihre Nutzung für die Raumfahrt werden aktiv erforscht; schon heute werden Sporen industriell hergestellt, beispielsweise für den Einsatz in Probiotika in der Tierzucht und im biologischen Pflanzenschutz [1]. Sporen faszinieren Menschen seit ihrer ersten Beschreibung im

19. Jahrhundert durch Robert Koch und Ferdinand Cohn und werden bis heute intensiv studiert.

Spezielle Programme steuern Sporulation und Aufleben

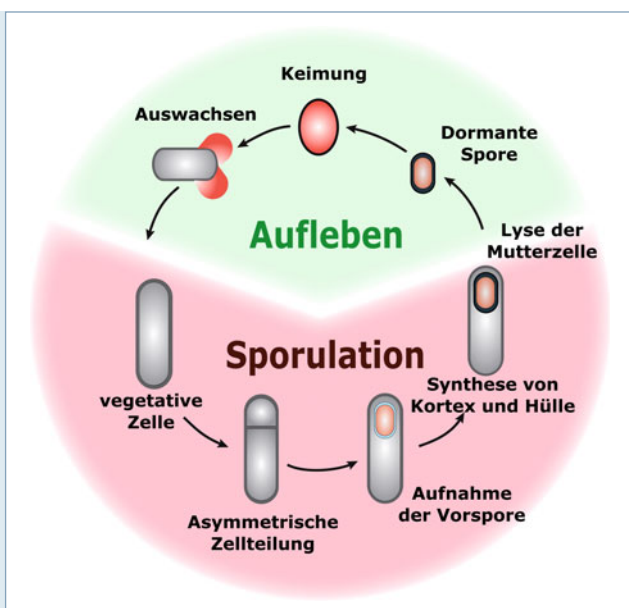
Die Sporulation und das Aufleben sind am besten in *Bacillus subtilis* erforscht (Abb. 1). Bei der Sporulation teilt sich das stäbchenförmige Bakterium asymmetrisch; die kleinere der beiden Zellen (Vorspore) wird anschließend von der größeren Mutterzelle umschlossen, reift in deren Inneren zur Spore heran und wird schließlich durch die Auflösung der Mutterzelle freigesetzt. Über 500 der mehr als 4.000 *Bacillus*-Gene sind an der Sporulation beteiligt. Eine quervernetzte Regulationskaskade koordiniert ihre Expression über beide Zellen hinweg [2]. Umgekehrt ist ein Drittel des Genoms am Aufleben beteiligt. Das Aufleben erfolgt in zwei Stufen: Bei der Keimung verliert die Spore ihre Resistenz, und die Dormanz wird gebrochen. Beim Auswachsen bildet sich dann eine neue vegetative Zelle.

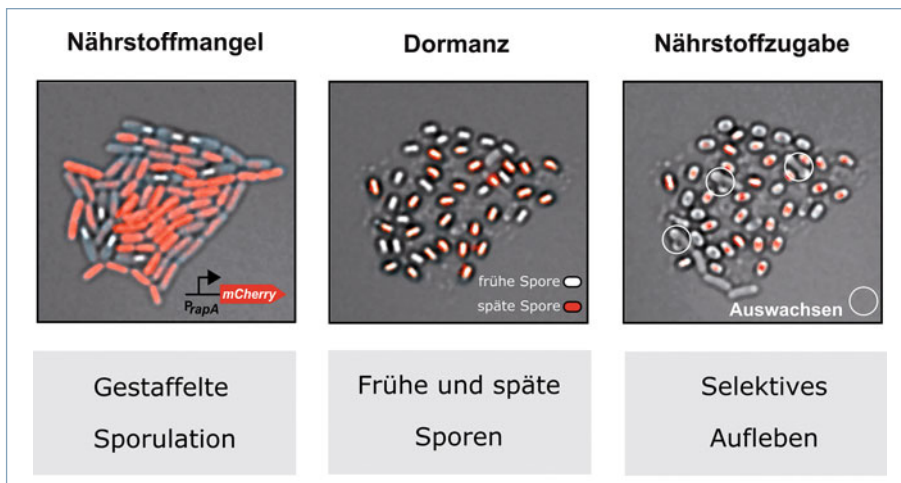
Sporulation und Aufleben sind irreversible Prozesse und werden durch zelleigene Signaltransduktionswege aktiviert: Spezielle Rezeptoren der Spore reagieren auf ausgewählte Nährstoffe, wie Glucose oder bestimmte Aminosäuren und lösen die Keimung aus [3]. In der vegetativen Zelle werden verschiedene interne und externe Signale (z. B. zum Zellzyklus oder metabolischen Zustand der Zelle, extrazelluläre Kommunikationssignale etc.) über Sporulations-Kinasen und -Phosphatasen über eine Signalkaskade (das „Sporulations-Phosphorelay“) integriert und regulieren den Zeitpunkt der Sporulation.

Der Lebenszyklus im Zeitraffer

In einem Lebenszyklus, der von schwankender Nährstoffverfügbarkeit geprägt ist, sind zum Überleben Sporulation und Aufleben erforderlich. Trotzdem wurden diese bisher getrennt voneinander untersucht. Die Lichtmikroskopie ist dafür ein wichtiges Werkzeug, denn die verschiedenen Entwicklungs-

► **Abb. 1:** Sporulation und Aufleben im Modellorganismus *Bacillus subtilis*. Bei der Sporulation teilt sich die Zelle zunächst asymmetrisch und nimmt die kleinere Zelle als Vorspore auf. Nach Bildung von Sporenkortex und Sporenhülle in der Mutterzelle lysiert diese und setzt die Spore frei. Das Aufleben umfasst die Keimung (bei der die Spore ihre Resistenz und Dormanz verliert) und das Auswachsen (bei der eine neue Zelle aus der gekeimten Spore herauswächst).





▲ **Abb. 2:** Der Lebenszyklus von *Bacillus subtilis* im Zeitraffer mit einem fluoreszenten Reporterstamm. Die Expression des rot-fluoreszierenden Proteins mCherry wird vom *rapA*-Promoter kontrolliert. Hellfeld- (grau) und Fluoreszenzbilder (rot) wurden digital überlagert. Links: Die Sporen entstehen zeitlich gestaffelt. Erste Zellen sporulieren und haben bereits (lichtbrechende, daher weiß erscheinende) Vorsporen in der Mutterzelle. Andere Zellen (rot) verzögern die Sporulation durch Expression der Sporulations-Phosphatase RapA und teilen sich zunächst weiter. Mitte: Nach vier Tagen ist die Sporenbildung abgeschlossen. Späte Sporen sind fluoreszenzmarkiert und unterscheiden sich von frühen Sporen in der Bildüberlagerung durch eine rote Umrandung. Rechts: Nach Zugabe von L-Alanin keimen fast alle Sporen und verlieren ihre Brechkraft. Frühe Sporen keimen allerdings schneller, und nur wenige – und ausschließlich frühe – Sporen wachsen aus.

stadien sind klar erkennbar. Seit kurzem ist es technisch möglich, erstmals beide Prozesse gemeinsam im Zeitraffer zu beobachten [4]. Dabei verfolgt man die Bildung von Sporen unter Nährstoffmangel auf einem Hydrogel und beobachtet nach Zugabe neuer Nährstoffe das Aufleben der Sporen (Video: <https://doi.org/10.5446/33993>). Zusammen mit fluoreszenten Reporterproteinen und Videoanalyse ist dies ein mächtiges Werkzeug, um neue Einblicke in den komplexen Lebenszyklus sporulierender Bakterien zu gewinnen.

Der Zeitraffer verdeutlicht, dass die Sporenbildung ein mehrzelliger Prozess ist (**Abb. 2**). Die Sporen entstehen zeitlich gestaffelt aus einer Vorläuferzelle über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Die einzelne Zelle entscheidet in jedem Zellzyklus mithilfe des Sporulations-Phosphorelays, ob sie sich nochmals teilt oder die Sporulation einleitet. Nach vier Tagen sind (fast) alle Zellen sporuliert. Gemäß ihres Sporulationszeitpunkts unterscheidet man „frühe“ und „späte“ Sporen. Ob bzw. wann eine Spore mit neuen Nährstoffen auflebt, ist scheinbar dem Zufall überlassen. Korreliert man allerdings das Aufleben der Sporen mit ihrer Entstehungsgeschichte, so zeigt sich, dass frühe Sporen schneller keimen und mit höherer Wahrscheinlichkeit auswachsen als späte Sporen. Weitere Experimente bestätigten, dass der Sporulationszeitpunkt – unabhän-

gig von räumlichen oder etwaigen Alterungseffekten – die Eigenschaften einer Spore dauerhaft beeinflusst und damit die Fähigkeit zum Aufleben [4].

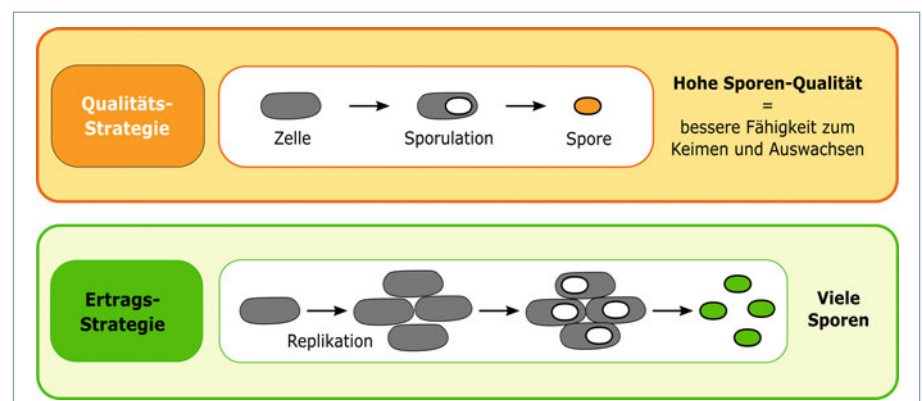
Lebenszyklus-Strategien: Masse oder Klasse?

Betrachtet man die Sporenbildung als multi-zelluläres Phänomen, so kann der beobachtete Zusammenhang zwischen Sporulationszeitpunkt und Auflebefähigkeit als Zielkonflikt (Trade-Off) gedeutet werden (**Abb. 3**): Mit jeder Zellteilung vor der Sporulation

erhöht sich die Gesamtanzahl der gebildeten Sporen. Im Gegensatz dazu führt eine schnelle Sporenbildung zwar zu einem geringeren Sporenertrag, jedoch haben diese bessere Aussichten, mit neuen Nährstoffen teilungsfähige Zellen auszubilden. Unter der Annahme, dass die Fähigkeit der Spore zum Auswachsen von ihrer intrinsischen Qualität abhängt, ergibt sich ein Konflikt zwischen Sporenertrag und Sporenqualität nach dem Motto: „Masse oder Klasse“.

Trade-Offs sind in der Natur weit verbreitet [5] und beispielsweise für die Produktion von Pflanzensamen und Eiern von Insekten oder Fischen bekannt. Je nach Umgebung kann eine erhöhte Quantität oder Qualität für eine Spezies vorteilhaft sein und zu einer Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen und Lebensräume führen. Dies ist allerdings nicht zwangsläufig der Fall, denn Verlusten an Quantität stehen Gewinne an Qualität gegenüber, und beide Effekte können sich kompensieren. Für die Sporenbildung gibt es erste Hinweise, dass ein ähnlicher Trade-Off existiert und dass dieser für die Entwicklung unterschiedlicher Lebenszyklus-Strategien in *B. subtilis* relevant ist [6].

In der Natur sporuliert *B. subtilis* im Boden und im Darm, und dort können Sporen auch jeweils auswachsen [7]. Unter anderem untersuchten wir daher den Lebenszyklus von zwei Isolaten aus dem Boden [8] bzw. Huhn [9] mit dem Zeitraffer genauer [6]. Die beiden Stämme verwenden unterschiedliche Strategien: Das Bodenisolat bildet fast doppelt so viele Sporen wie das Huhnisolat; es setzt bei der Sporenbildung somit auf „Masse“, das Huhnisolat dagegen auf „Klasse“. Jede Strategie hat ihre Vorteile: Nach Zugabe



▲ **Abb. 3:** Masse oder Klasse? Schematisch vereinfachte Darstellung alternativer Lebenszyklus-Strategien bei der Sporenbildung von *Bacillus subtilis*. Oben: Bei der Qualitätsstrategie sporuliert die Zelle ohne weitere Zellteilung und bildet eine Spore mit hoher Qualität, d. h. mit guten Fähigkeiten zum Keimen und Auswachsen. Unten: Bei der Quantitätsstrategie teilt sich die Zelle vor der Sporulation und bildet viele Sporen aus, allerdings mit Abstrichen in der Sporenqualität.

eines nährstoffreichen Komplexmediums wachsen fast alle Sporen aus. In dieser Umgebung gilt „Masse statt Klasse“, und das Bodenisolat ist aufgrund des höheren Sporenertrags klar im Vorteil. Umgekehrt ermöglicht der Keimungstrigger L-Alanin zusammen mit Nährstoffüberresten aus der Sporulation nur einigen wenigen Sporen die Rückkehr zur teilungsfähigen Zelle. Jetzt ist die Sporenqualität für den Erfolg ausschlaggebend. Die Sporen des Huhnisolats sind hochwertiger, und trotz des geringeren Sporenertrags wachsen im Vergleich zum Bodenisolat mehr Sporen aus [6].

Reflektiert das Sporulationsverhalten der beiden Isolate also eine Anpassung an das Aufleben von Sporen im Darm oder Boden? Vielleicht. Zumindest könnten die Umgebungsbedingungen für unterschiedliche Lebenszyklus-Strategien selektiv sein.

Erste Experimente mit einem Modellsystem stützen diese Hypothese. Durch gesteuerte Expression einer Sporulationskinase lässt sich die Sporulationswahrscheinlichkeit einstellen. Die erzeugten Veränderungen in der Lebenszyklus-Strategie wirken sich beim Aufleben in nährstoffreichen bzw. -armen Umgebungen entsprechend der Vorhersagen auf die Fitness aus [6]. Auch die Strategie der natürlichen Isolate lässt sich umprogrammieren. Im Genom des Bodenisolats findet sich eine Reihe von zusätzlichen *rap-phr*-Signalsystemen, die die Aktivität im Sporulations-Phosphorelay hemmen und somit die Sporulationswahrscheinlichkeit herabsetzen [10]. Überführt man die Signalsysteme ins Genom des Huhnisolats, so verfolgt dieses nun die Ertragsstrategie mit entsprechenden Konsequenzen für die Fitness [6].

Von den Grundlagen zur Anwendung

Trade-Offs entstehen in der Natur als Folge beschränkter Ressourcen [5]. Um welche Ressourcen es sich im Einzelnen handelt und wie diese die Qualität auf molekularer Ebene bestimmen, ist meist ungeklärt. Die Alanin-

Dehydrogenase – ein Enzym, das den Nährstoff und Keimungstrigger L-Alanin zu Pyruvat verstoffwechselt – beeinflusst zumindest unter bestimmten Bedingungen die Sporenqualität in *B. subtilis* und das Auswachsen, aber nicht die Keimung [4, 6]. Welche weiteren Qualitätsmerkmale einer Spore über den Sporulationszeitpunkt bestimmt werden und wie der Organismus die Sporenbildung beispielsweise über Zell-Zell-Kommunikation steuert [11], muss weiter untersucht werden.

Auch für die angewandte Forschung ist der Trade-Off zwischen Sporenertrag und -qualität möglicherweise relevant. Weltweit produzieren Biotechnologieunternehmen Tonnen an Sporen. Für die Prozessoptimierung im Bioreaktor ist der Sporentiter ein entscheidender Parameter. Inwiefern sich dies auf die Qualität der Sporen auswirkt, ist eine wichtige Fragestellung, um Fermentationsprozesse in Zukunft zu verbessern.

Auch wenn es in der Vergangenheit gute Gründe gab, Sporulation und Aufleben getrennt voneinander zu studieren, ist es jetzt an der Zeit, den Lebenszyklus in seiner Gesamtheit zu betrachten. Dies lehrt uns, wie komplex adaptives Verhalten entsteht und eröffnet neue Möglichkeiten, dieses Wissen für den Menschen nutzbar zu machen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Alper Mutlu, und allen Kollaborationspartnern für ihre vielfältigen Beiträge sowie den Förderorganisationen (DFG, ERC, MPG). ■

Literatur

- [1] Paul C, Filippidou S, Jamil I et al. (2019) Bacterial spores, from ecology to biotechnology. *Adv Appl Microbiol* 9:79–111
- [2] Higgins D, Dworkin J (2012) Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* 36:131–148
- [3] Setlow P, Wang S, Li Y (2017) Germination of spores of the orders Bacillales and Clostridiales. *Annu Rev Microbiol* 71:459–477
- [4] Mutlu A, Trauth S, Ziesack M et al. (2018) Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff. *Nat Commun* 9:69
- [5] Smith CC, Fretwell SD (1974) The optimal balance between size and number of offspring. *Am Nat* 108:499–506

- [6] Mutlu A, Kaspar C, Becker N, Bischofs IB (2020) A spore quality-quantity tradeoff favors diverse sporulation strategies in *Bacillus subtilis*. *ISME J*, <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0721-4>
- [7] Earl AM, Losick R, Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol* 16:269–275
- [8] Durrett R, Miras M, Mirouze N et al. (2013) Genome sequence of the *Bacillus subtilis* biofilm-forming transformable strain PS216. *Genome Announc* 1:e00288–13
- [9] Schyns G, Serra CR, Lapointe T et al. (2013) Genome of a gut strain of *Bacillus subtilis*. *Genome Announc* 1:e00184–12
- [10] Serra CR, Earl AM, Barbosa TM et al. (2014) Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 196:4184–4196
- [11] Babel H, Naranjo-Meneses P, Trauth S et al. (2020) Ratiometric population sensing by a pump-probe signaling system in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* 11:1176

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Open Access Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Ilka Bischofs
MPIterMic Gruppe Complex Adaptive Traits (CATs)
BioQuant der Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 267
D-69120 Heidelberg
ilka.bischofs@bioquant.uni-heidelberg.de
ilka.bischofs@mpi-marburg.mpg.de
www.mpi-marburg.mpg.de/bischofs
www.bioquant.uni-heidelberg.de/research/groups/bacterial-signaling-networks/home.html

AUTORIN



Ilka Bischofs

1996–2001 Physikstudium an der Universität Würzburg und der State University of New York at Stony Brook, NY, USA. 2001–2004 Promotion (Physik) am Max Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächen, Potsdam. 2005–2010 Postdoc, University of California, Berkeley/Lawrence Berkeley National Laboratory, CA, USA und Universität Heidelberg. 2010–2016 Emmy-Noether- und ERC-StG-Nachwuchsgruppe, Universität Heidelberg. Seit 2016 unabhängige Forschungsgruppe „Complex Adaptive Traits“ (CATs), Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie/Universität Heidelberg.