

Marine Mikrobiologie

Bakterielle Mechanismen der marinen Polysaccharidverwertung

THOMAS SCHWEDER¹, UWE BORNSCHEUER², JAN-HENDRIK HEHEMANN³,
RUDOLF AMANN⁴

¹ PHARMAZEUTISCHE BIOTECHNOLOGIE, INSTITUT FÜR PHARMAZIE,
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

² BIOTECHNOLOGIE & ENZYMKATALYSE, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE,
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

³ MARINE GLYKOBIOLOGIE, MARUM, UNIVERSITÄT BREMEN

⁴ MOLEKULARE ÖKOLOGIE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MARINE MIKROBIOLOGIE,
BREMEN

The oceans have been compared to a “global heterotrophic digester”. This is due to the high productivity of microalgae and the rapid turnover of the produced biomass by microbes. A major part of the algal biomass consists of diverse polysaccharides which belong to the most complex polymer structures in nature. These marine sugars are decomposed by specialized bacteria, mainly of the phyla Bacteroidetes and Gammaproteobacteria, which possess dedicated conserved gene clusters encoding a remarkable diversity of carbohydrate-active enzymes.

DOI: 10.1007/s12268-020-1489-9

© Die Autoren 2020

■ Jährlich wiederkehrende, massive Algenblüten in den Auftriebszonen und Küstenschelfgebieten der Ozeane bestimmen die Primärproduktion mariner Ökosysteme. Marine Algen leisten etwa die Hälfte der weltweiten photosynthetischen Netto-Primärproduktion. Die Algen bestehen zum Großteil aus Polysacchariden – großen Koh-

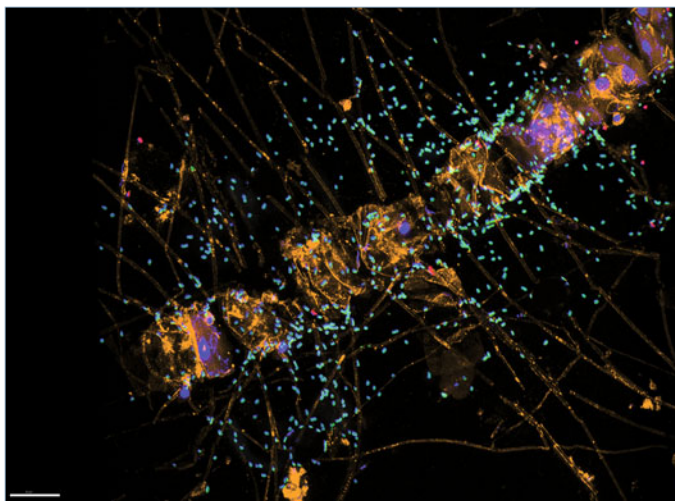
lenhydraten, die aus mehreren Zuckermolekülen bestehen und die als Speicherstoff, in Zellwänden oder als intra- oder extrazelluläre Matrixpolysaccharide dienen. Algen produzieren viele Arten von Polysacchariden, die unterschiedlich komplex sind und sich von denen von Landpflanzen teils deutlich unterscheiden. Die Zuckermoleküle, aus

denen Polysaccharide bestehen, können auf verschiedene Weise verknüpft und mit einer Vielzahl an funktionellen Gruppen (z. B. Sulfat-, Methyl- oder Acetylgruppen) dekoriert werden [1]. So kommt es, dass Polysaccharide die chemisch komplexesten Makromoleküle in der Natur sind.

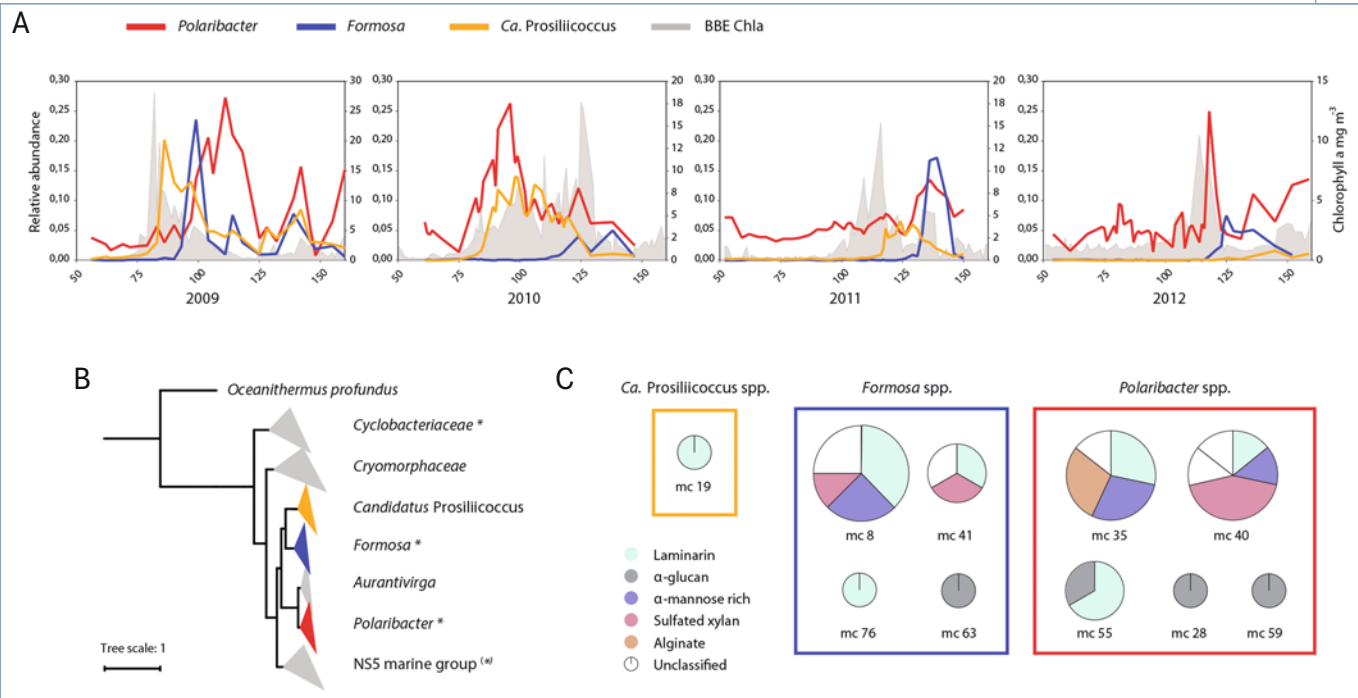
Wiederkehrende Sukzession von Bakteriengruppen in Phytoplanktonblüten

Heterotrophe Bakterien (**Abb. 1**) spielen eine wesentliche Rolle bei der Zersetzung organischer Stoffe im Meer. Phytoplanktonblüten in der Deutschen Bucht, die meist von Kieselalgen dominiert sind, werden von einer Jahr für Jahr wiederkehrenden Sukzession verschiedener Bakteriengruppen begleitet, in der verschiedene Taxa schnell aufeinanderfolgenden [2, 3, 4]. In mehreren Untersuchungen wurden dabei Flavobakterien und Gammaproteobakterien als Hauptakteure identifiziert. In Frühjahrsblüten dominierten u. a. die Flavobacteriia-Gattungen *Formosa* und *Polaribacter* (**Abb. 2**). Kombinierte Metagenom- und Metaproteomanalysen zeigten, dass die Bakteriensukzession mit einem raschen Wechsel des bakteriellen Genrepertoires einhergeht. Die Zusammensetzung und Funktion des Bakterioplanktons ändert sich im Verlauf der Algenblüte parallel zur verfügbaren Nahrung.

Marine Bakterien, die auf die Zersetzung von Algenpolysacchariden spezialisiert sind, weisen eine bemerkenswerte Vielfalt an kohlenhydrataktiven Enzymen (CAZymes) auf. Algenpolysaccharide sind jedoch zu vielfältig, als dass eine einzelne Bakterienart sie alle abbauen könnte. Kein Bakterium enthält alle Gene, die zur Verwertung aller vorhandenen Polysaccharide erforderlich sind. Der Abbau eines so komplexen Polysaccharidgemischs, wie es im Laufe einer Algenblüte auftritt, erfordert Teamarbeit: Einzelne Bakteriengruppen sind spezialisiert auf unterschiedliche Algenpolysaccharide und deren Bestandteile. Gemeinsam bauen sie die Algenblüte ab. Diese Art der Ressourcen- und Nischenverteilung wurde beispielhaft für die Gattung *Formosa* gezeigt [5].



◀ **Abb. 1:** Polysaccharid-abbauende Bakterien der Bacteroidetes-Gruppe (türkis, identifiziert über Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) an der Diatomee (Kieselalge) *Chaetoceros* sp. Fluoreszenzmikroskopie, Maßstabsbalken = 10 µm. Foto: Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie/I. Bakenhus



▲ **Abb. 2:** Mikroalgenblüten sind durch wiederkehrende Bakteriensukzessionen mit definierten *polysaccharide utilization loci* (PULs) gekennzeichnet. **A,** Häufigkeitsmuster ausgewählter Hauptgruppen von Flavobacteriia, die während Phytoplanktonblüten nachgewiesen wurden. **B,** phylogenetischer Baum von abundanten Bakterienarten aus Frühlingsblüten. Gruppen, für die Isolate und Genome verfügbar sind, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. **C,** PUL-Repertoires für den Zuckerabbau der jeweiligen Arten. Kreisdiagramme zeigen die vorhergesagten PUL-Substrate für jedes Taxon und werden gemäß der PUL-Häufigkeit dimensioniert.

Gene für den Zuckerabbau sind genomisch geklustert

CAZyme-codierende Gene sind in Bakterien-genomen häufig in *polysaccharide utilization loci* (PULs) organisiert (**Abb. 2**). PULs sind operonähnliche Genfolgen, die für Glycosidhydrolasen, Kohlenhydrat-bindende Proteine, Sulfatasen, TonB-abhängige Transporter und Polysaccharid-bindende Proteine codieren. Unsere vergleichende Sequenzanalyse von Genomen kultivierbarer Isolate [6] und von Metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) [7] ergab, dass viele planktonische marine Bacteroidetes kleine Genome und eine begrenzte Anzahl von PULs haben. Viele dieser Polysaccharid-abbauenden Bakterien sind also hoch spezialisiert auf wenige Zucker [5, 6]. Im Gegensatz dazu sind Partikel- oder Makroalgen-assoziierte Bakterien wie *Formosa agariphila* KMM3901^T [8] oder *Gramella forsetii* KT0803^T [9, 10] Generalisten und verwerten viele verschiedene Polysaccharide.

Bakterien nutzen komplexe Enzymkaskaden für den Zuckerabbau

Detaillierte hochaufgelöste Metaproteomanalysen von Wasserproben zeigten, dass Polysaccharid-spezifische Transporter und Bindproteine während des bakteriellen Abbaus von Algenbiomasse zu den am häufigsten exprimierten Proteinen gehören [2]. Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei

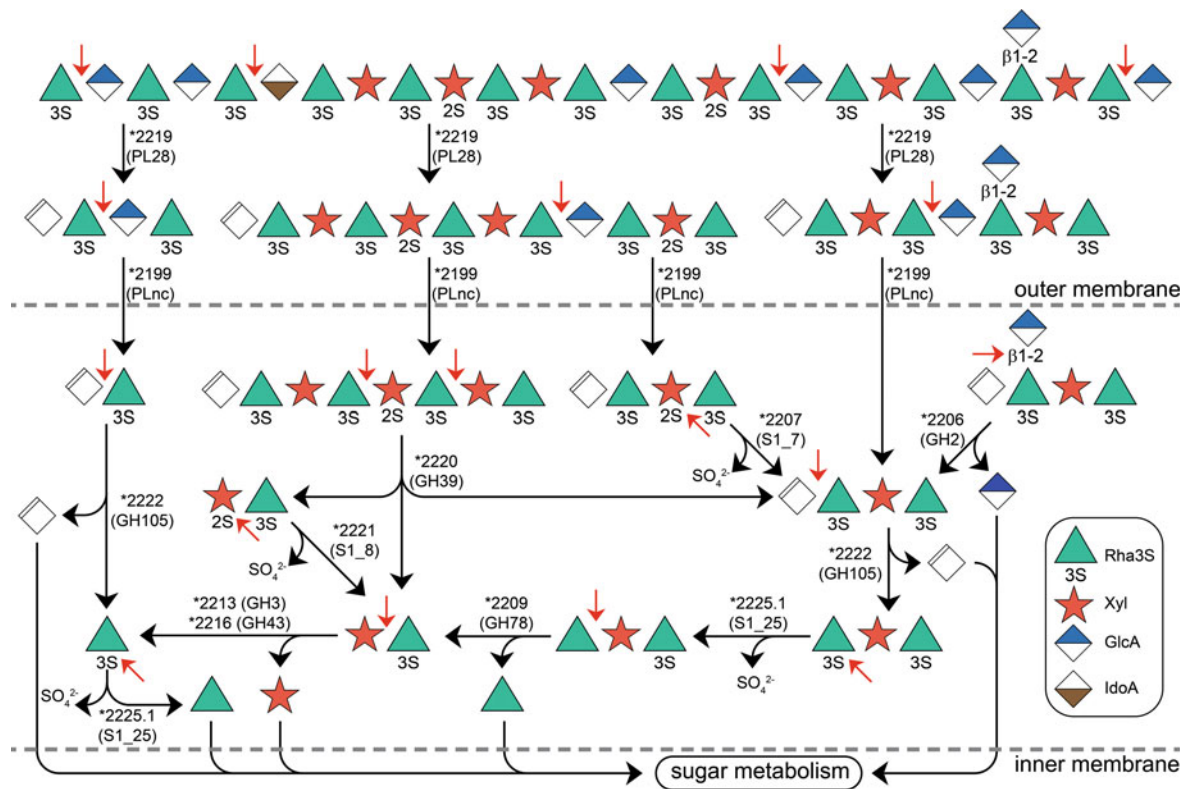
der Aufnahme von Oligosacchariden. Unsere Studien weisen darauf hin, dass TonB-abhängige Transporterproteine dazu genutzt werden können, unter *in situ*-Bedingungen Rückschlüsse auf die von den Bacteroidetes genutzten Polysaccharide zu ziehen [6].

Eine Vielzahl von Proteinfunktionen sind nötig, damit Bakterien die komplexen Algenpolysaccharide verwerten können. So konnte gezeigt werden, dass die stark sulfatierte Struktur von Fucoïdanen durch „Lentimonas“ sp. CC4, ein Vertreter der Verrucomicrobia, mittels einer bemerkenswert komplexen Enzym-Maschinerie abgebaut wird [11]. Dieses Bakterium enthält Gene für 284 mutmaßliche Fucoïdanasen, einschließlich Glycosidhydrolasen, Sulfatasen und Kohlenhydratesterasen. Substratspezifische *in vitro*-Kulturen weisen darauf hin, dass etwa 100 Enzyme erforderlich sind, um individuelle Fucoïdane aus verschiedenen Algenarten abzubauen. Diese Abbaupfade enthalten aufeinander abgestimmte Enzymkaskaden. Zunächst werden die komplexen Polysaccharide außerhalb der Zelle zu Oligosacchariden zerkleinert, die dann durch hochspezifische Aufnahmesysteme in das Periplasma der Bakterien transportiert und dort weiter in Di- bzw. Monosaccharide abgebaut werden. Eine solche komplexe Enzymkaskade konnte in einer aktuellen Studie aufgeklärt werden: In dem marinen Bacteroidetes-Stamm *F. agariphila* fand man ein PUL

mit über 30 Genen, das für den Abbau des komplexen sulfatierten Polysaccharids Ulvan zuständig ist [12]. Ein kombinierter Ansatz aus metabolischer Markierung und Subproteomfraktionierung ermöglichte es, die bisher unbekannt Funktion von mehr als zehn Enzymen in diesem PUL zu entschlüsseln und erstmalig die Enzymkaskade für den Abbau von Ulvan abzubilden (**Abb. 3**).

Häufig sind am Zuckerabbau auch „Hilfs“-Enzyme beteiligt. Kürzlich konnten wir zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen in marinen Bakterien identifizieren, die zusammen mit geeigneten Redox-Partner-Proteinen die oxidative Demethylierung von 6-O-Methyl-D-Galaktose [13] – einem Monosaccharid, das in den Algenpolysacchariden Agarose und Porphyrin enthalten ist – katalysieren. Diese Entdeckung erweitert die Gruppe der kohlenhydrataktiven Hilfsenzyme.

Mehr als 98 Prozent der polysaccharidreichen partikulären organischen Substanz in der Wassersäule wird mineralisiert. Bakterien können Polysaccharide also offensichtlich schnell recyceln. Diese Prozesse haben einen tiefgreifenden Einfluss auf den globalen Kohlenstoffkreislauf, die biologische Pumpenfunktion der Ozeane und damit das Erdklima. Die Ozeane erwärmen sich. Wie wirkt sich das auf die Aktivität der Polysaccharid-abbauenden Bakterien aus und was bedeutet das für die Polysaccharid-Kohlenstoffspeicherung im Ozean? Um solche Fragen zu



▲ **Abb. 3:** Enzymkaskade von *Formosa agariphila* zum Abbau des Algenpolysaccharids Ulvan [12]. Zahlen mit einem „S“ an den Zuckersymbolen zeigen die Position der Sulfatgruppen. Nummern mit einem * weisen auf die Zugangsnummern der jeweiligen Enzyme hin. Rote Pfeile kennzeichnen mögliche Schnittstellen der Enzyme. Rha3S: L-Rhamnose-3-Sulfat; Xyl: D-Xylose; GlcA: D-Glucuronsäure; IdoA: L-Iduronsäure

beantworten, die den Abbau von Phytoplanktonblüten durch Mikroorganismen, ihre Stoffwechselwege und Enzyme betreffen, müssen wir diese zentralen Teile des marinen Kohlenstoffkreislaufs detailliert verstehen. Hier besteht also weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die Förderung ihrer Arbeiten im Rahmen der DFG-Forschungsgruppe FOR 2406 „Proteogenomics of marine polysaccharide utilization (POMPU)“ und bei allen Verbundpartnern für die fruchtbare Zusammenarbeit. ■

Literatur

- [1] Bornscheuer U, Buchholz K, Seibel J (2014) Enzymatic degradation of (ligno)cellulose. *Angew Chem Int Ed Engl* 53:10876–10893
- [2] Teeling H, Fuchs BM, Becher D et al. (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* 336: 608–611
- [3] Teeling H, Fuchs BM, Bennis CM et al. (2016) Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae blooms. *Elife* 5:e11888
- [4] Chafee M, Fernandez-Guerra A, Buttigieg PL et al. (2018) Recurrent patterns of microdiversity in a temperate coastal marine environment. *ISME J* 12:237–252
- [5] Unfried F, Becker S, Robb CS et al. (2018) Adaptive mechanisms that provide competitive advantages to marine bacteroidetes during microalgal blooms. *ISME J* 12: 2894–2906
- [6] Kappelmann L, Kruger K, Hehemann JH et al. (2019) Polysaccharide utilization loci of North Sea *Flavobacterium* as basis for using SusC/D-protein expression for predicting major phytoplankton glycans. *ISME J* 13:76–91
- [7] Krüger K, Chafee M, Ben Francis T et al. (2019) In marine Bacteroidetes the bulk of glycan degradation during algae

blooms is mediated by few clades using a restricted set of genes. *ISME J* 13:2800–2816

- [8] Mann AJ, Hahnke RL, Huang S et al. (2013) The genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 79:6813–6822
- [9] Bauer M, Kube M, Teeling H et al. (2006) Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes *Gramella forsetii* reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environ Microbiol* 8:2201–2213
- [10] Kabisch A, Otto A, König S et al. (2014) Functional characterization of polysaccharide utilization loci in the marine Bacteroidetes *Gramella forsetii* KT0803. *ISME J* 8:1492–1502
- [11] Sichert A, Corzett CH, Schechter MS et al. (2020) Verrucomicrobia use hundreds of enzymes to digest the algal polysaccharide fucoindan. *Nat Microbiol* 5:1026–1039
- [12] Reisky L, Préchoux A, Zühlke MK et al. (2019) A marine bacterial enzymatic cascade degrades the algal polysaccharide ulvan. *Nat Chem Biol* 15:803–812
- [13] Reisky L, Büchsenstutz HC, Engel J et al. (2018) Oxidative demethylation of algal carbohydrates by cytochrome P450 monooxygenases. *Nat Chem Biol* 14:342–344

Funding note: 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:

Prof. Dr. Thomas Schweder
 Center for Functional Genomics of Microbes (C_FunGene)
 Abt. Pharmazeutische Biotechnologie,
 Institut für Pharmazie
 Universität Greifswald
 D-17487 Greifswald
 schweder@uni-greifswald.de
 www.pompu-project.de



Thomas Schweder, Rudolf Amann, Uwe Bornscheuer und Jan-Hendrik Hehemann (v. l. n. r.)