

Bakterielle Signale

Efficiency Sensing – was messen Autoinduktoren wirklich?

BURKHARD A. HENSE¹, CHRISTINA KUTTLER¹, JOHANNES MÜLLER^{1,2}, MICHAEL ROTHBALLER³, ANTON HARTMANN³, JAN-ULRICH KREFT⁴

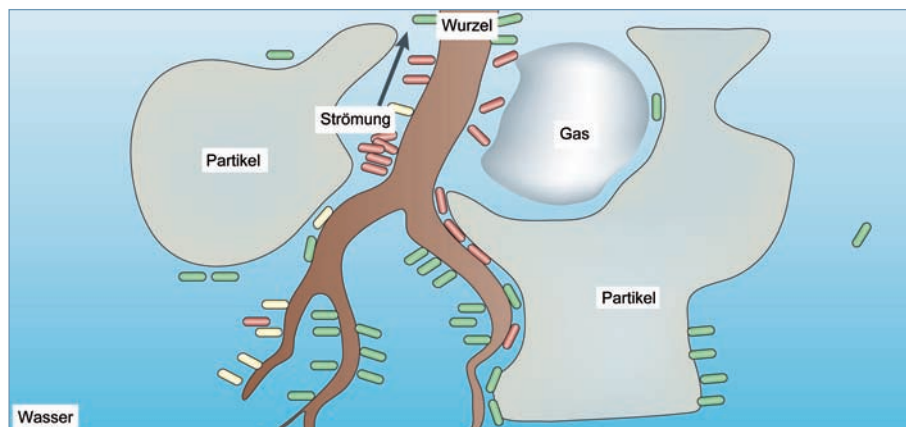
¹INSTITUT FÜR BIOMATHEMATIK UND BIOMETRIE, HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN – DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT, ²ZENTRUM MATHEMATIK, TU MÜNCHEN, GARCHING/MÜNCHEN, ³ABTEILUNG MIKROBEN-PFLANZEN INTERAKTIONEN, HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN – DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT, ⁴CENTRE FOR SYSTEMS BIOLOGY, SCHOOL OF BIOSCIENCES, UNIVERSITY OF BIRMINGHAM, UK

Viele Bakterienarten regulieren ihr Verhalten in Abhängigkeit von der Zelldichte – *in vitro*. Dies wird ermöglicht durch die Sekretion kleiner Moleküle, den Autoinduktoren. Als generelle *in situ*-Funktion wird Efficiency Sensing vorgeschlagen.

We propose that bacteria release diffusible autoinducers as proxies for testing the efficiency of producing extracellular effectors (efficiency sensing).

■ Autoinduktoren (AI) sind kleine, frei diffundierende Signalstoffe, die von Bakterienzellen kontinuierlich in kleiner Menge freigesetzt werden. Gleichzeitig messen die Zellen die Umgebungskonzentration der AI mithilfe spezifischer Rezeptorproteine. Oberhalb einer Schwellenkonzentration wird über die Induktion von Genexpression der Phänotyp reguliert, oft durch die Freisetzung von Effektoren (zelluläre Substanzen, die außerhalb der Zelle wirken, beispielsweise Exoenzyme oder Virulenzfaktoren). Als funktionelle

Gemeinsamkeit zeigen fast alle untersuchten AI eine positive Rückkoppelung, das heißt die AI induzieren die Gene für ihre eigene Produktion. AI kontrollieren zentrale Eigenschaften wichtiger Bakterien. Um gezielt eingreifen zu können, etwa in der Medizin (Antibiotikaersatz), bei Pflanzen-assoziierten Bakterien in der Landwirtschaft (Wachstumsförderung) sowie in der Biotechnologie (Hemmung von Biofilmbildung), ist es entscheidend zu verstehen, wie AI-Systeme unter natürlichen Bedingungen funktionieren.



▲ **Abb. 1:** Bakterien leben meist ungleichmäßig verteilt in räumlich strukturierten Lebensräumen, umgeben von Zellen anderer Arten.¹

Da alle Zellen die gleiche Menge AI produzieren, geschieht die Induktion, zumindest in durchmischten Laborkulturen – zell-dichteabhängig – wofür der Begriff Quorum Sensing (QS) geprägt wurde^[1]. Diese zuerst bei Leuchtbakterien beschriebene Form der Kommunikation^[2] wird inzwischen für ein weit verbreitetes Prinzip gehalten. Die meisten AI gehören zu drei Molekülklassen: N-Acylhomoserinlactone (AHLs) in Gram-negativen Bakterien, Oligopeptide in Gram-positiven Bakterien und der erst kürzlich entdeckte Autoinduktor-2 (AI-2), der eine Mischung von Furanonen im chemischen Gleichgewicht darstellt^[3]. AI-2 kommt in Bakterien verschiedener Taxa vor, weshalb postuliert wurde, dass er als universales Signal der zwischenartlichen Kommunikation dient.

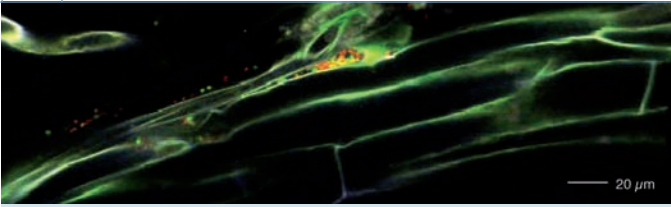
QS erlaubt den Zellen einer Population zu kooperieren. Die Zellen induzieren *in vitro* bei Überschreitung der AI-Schwellenkonzentration koordiniert die Effektorproduktion. Das erlaubt es Bakterien, die als einzelne Zellen nur sehr beschränkt Einfluss auf ihre Umwelt nehmen können, diese stärker zu verändern, etwa durch Exkretion einer wirksamen Menge von Exoenzymen. Gleichzeitig werden konzertierte Aktionen möglich, wie der Angriff gegen sich verteidigende Wirtsgewebe oder die Verteidigung gegen Angreifer (z. B. Immunzellen).

Obwohl attraktiv, wurde die Existenz solch kooperativen Verhaltens unter natürlichen Bedingungen selten wirklich nachgewiesen. Für das Funktionieren von QS *in situ* gibt es primär drei Problemfelder:

1. Räumliche Heterogenität

Die meisten Bakterien leben in räumlich heterogenen, zeitlich veränderlichen Lebensräumen (**Abb. 1**). Die von uns untersuchte Rhizosphäre ist durch Partikel, hochpolymere Gelmatrizes und wasser- oder luftgefüllte Räume inklusive Strömungen strukturiert.

¹ Abb. 1, 3 und 4 sind mit Genehmigung reproduziert nach ^[8].



▲ **Abb. 2:** AHL-produzierende und -detektierende *Pseudomonas putida*-Zellen auf einer Weizenwurzel. Grün: AHL-Produzenten, rot: nicht induzierte Sensorzellen, gelb: induzierte Sensorzellen.

Die Zellen wachsen ungleichmäßig verteilt auf Oberflächen, oft in Taschen oder Poren. All das beeinflusst die lokale Ausbreitung von AI, zudem ist eine Zelldichtemessung wie in flüssigen, durchmischten Laborkulturen kaum möglich. In der Tat konnte mit *in situ*-Reporterbakterien gezeigt werden, dass die AHL-Signalreichweite auf Wurzeloberflächen sehr inhomogen ist^[4].

2. Biodiversität

Angesichts der begrenzten Zahl nachgewiesener strukturell unterschiedlicher AHL-AI (<100) und der hohen Bakteriendiversität (z. B. in Boden geschätzte 100.000 bis 10 Mio. Arten pro 10 g) lässt sich eine Überlappung der Kommunikation verschiedener Arten (Cross-Talk) kaum vermeiden, selbst wenn nur ein Teil der Arten AHL produziert. Grundsätzlich könnte dies zum Nutzen der beteiligten Arten geschehen. Da es aber meist stark vom Zufall abhängt, welche Arten benachbart leben, steht angesichts verschiedener konkurrierender Lebensstrategien der generelle Nutzen und die evolutionäre Stabilität einer solchen artübergreifenden Kooperation in Frage. Das gilt auch für den vermuteten universalen Cross-Talk über AI-2. Bei den Grampositiven Bakterien ist wegen der höheren strukturellen Vielfalt der Oligopeptid-Signale dagegen Cross-Talk eher vermeidbar.

QS-Systeme sind *in situ* zudem der chemischen Manipulation durch andere Arten ausgesetzt. Nachgewiesen sind die Bildung von Agonisten, Antagonisten oder des AI selbst sowie die Aufnahme und/oder der enzymatische Abbau von AI.

3. Evolutionäre Stabilität

Bei jeder Art von Kooperation stellt sich die Frage, wie dieses Verhalten, das „Betrüger“ ausnutzen könnten, evolvieren kann^[5]. Bei QS werden von allen Zellen zwei Arten von Gemeingütern (also Güter, die auch für andere Zellen zu ihrem Vorteil frei verfügbar sind) freigesetzt: AI und Effektoren.

AI- oder mehr noch Effektor-defiziente Mutanten sparen sich die Kosten der Produktion, profitieren aber von den „ehrlichen“, AI- und/oder Effektor-produzierenden Mutan-

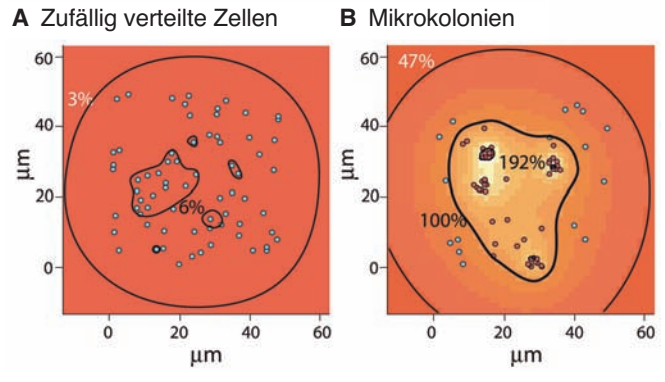
ten. Eine andere Form des Betrugs stellt die Überproduktion von AI dar, die andere Zellen (aber nicht die überproduzierende Mutante selbst) dazu bringt, die teure Produktion von Effektoren verfrüht zu starten. Wegen des direkten Fitnessvorteils solcher Mutanten bedrohen sie die Stabilität der Kooperationen. Bakterien können schwer zwischen „ehrlichen“ und „betrügerischen“ Zellen unterscheiden; eine Bestrafung von Betrügern ist deshalb nicht möglich. Die Förderung der Fitness von verwandten Zellen, Kin Selection, kann evolutionäre Stabilität fördern, etwa indem Gemeingüter bevorzugt unter diesen verteilt werden. Das Erkennen von Verwandten, ebenso wie die gezielte Verteilung von Gemeingütern an diese, ist Bakterien jedoch schwer möglich.

Diffusion Sensing

Redfield^[6] schlug Diffusion Sensing (DS) als Alternativklärung vor. Bei DS ist die Aufgabe der AI die Messung der Diffusions- oder besser Massentransferlimitierung der Umgebung, in der sich eine einzelne Zelle aufhält. Anhand der in der Umgebung verbleibenden, von der Zelle produzierten AI „schätzt“ diese den potenziellen Effektorverlust, bevor sie mit dessen teurer Produktion beginnt.

DS beinhaltet keine Kooperation, daher kann Betrug nicht stattfinden. DS unterliegt jedoch ebenfalls dem störenden Einfluss anderer Arten. Zudem produzieren andere artgleiche Zellen identische AI, wodurch eine unabhängige Bestimmung der Massentransferlimitierung der Umgebung unmöglich wird, sobald sich solche Zellen in der Umgebung befinden.

Die Hauptschwäche von QS und DS liegt in ihrer Fokussierung auf die Frage, welche Information für die Zellen nützlich sein könnte. Die im ersten Moment einleuchtenden Antworten Zelldichte (QS) beziehungsweise Diffusionsraum (DS) ignorieren jedoch die natürliche Umweltheterogenität.



▲ **Abb. 3:** Modell der AHL-Produktion, -Diffusion und -Regulation. **A**, Zufällig verteilte Zellen, **B**, Mikrokolonien. 70 Zellen wurden in 50 x 50 x 10 µm³ auf einer undurchlässigen Oberfläche bei unbegrenztem Diffusionsraum verteilt. Der Hintergrund zeigt die AHL-Konzentration (gelb: hoch, rot: niedrig), die Bakterienfarbe deren Aktivität (blau: nicht induziert; rot: induziert). Linien: Isokonzentrationen; %: AHL-Konzentration in Prozent der Schwellenkonzentration.¹

Für ein realistischeres Bild der AI-Funktion gilt es zunächst zu klären, was die Zelle in komplexer Umgebung mithilfe der AI wirklich erfährt und worin der Nutzen liegt.

Mikrokolonien

Um zu untersuchen, über welche Distanzen Kommunikation möglich ist, wurden Wildtyp-Zellen von *Pseudomonas putida*, die üblicherweise AHL freisetzen (Produzenten), zusammen mit AHL-defizienten Sensorzellen in Weizenrhizosphäre in vorher sterilisiertem Quarzsand angeimpft (**Abb. 2**). Die Produzenten sind mithilfe eines *gfp*-Gens markiert, das grün fluoresziert. Die Sensorzellen fluoreszieren bei niedriger AHL-Konzentration rot (*rfp*-Gen) und aufgrund eines zusätzlichen AHL-kontrollierten *gfp*-Gens^[7] bei hoher Konzentration gelb. Die 3-D-Auswertung von CLSM-Bildern ergab Kommunikationsdistanzen bis über 40 µm. Dabei ist die räumliche Anordnung der benachbarten Produzenten wichtig für die Induktion der Sensor-Bakterien. Im Gegensatz zu durchmischten Laborkulturen bilden sich an der Wurzeloberfläche Mikrokolonien. Sie entstehen, wenn sich Zellen auf Oberflächen festsetzen und unter günstigen Bedingungen zu teilen beginnen. Diese inhomogene Zellverteilung ist typisch für natürliche Lebensräume. Mathematische Modellierung zeigt, dass die Mikrokolonien, oder allgemeiner die räumliche Verteilung der Zellen, einen größeren Einfluss auf die von der einzelnen Zelle gemessene AI-Konzentration haben können als die Zelldichte selbst (**Abb. 3**). Obwohl oftmals vermischt, ist es für das Verständnis der AI-Funktion wichtig zu beachten, dass Zelldichte, wie sie dem QS-Konzept zugrunde liegt, und Zellverteilung zwei unabhängige

ge, nicht auseinander ableitbare Faktoren sind.

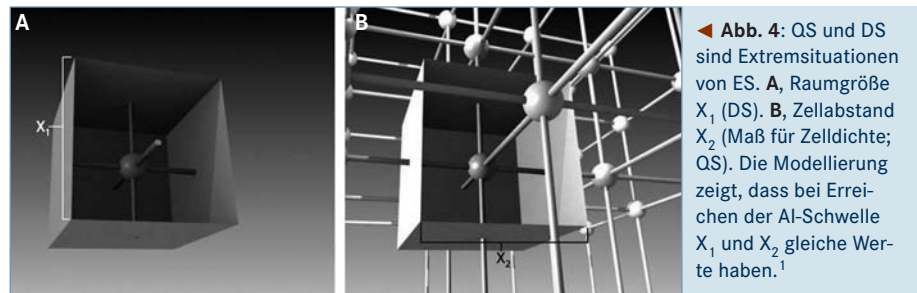
Efficiency Sensing, das vereinigende Konzept

Die von den Zellen bestimmte AI-Konzentration hängt damit von drei Faktoren ab: der Massentransferlimitierung, der Zelldichte und der Zellverteilung, wobei für die Zelle keiner der drei Faktoren isoliert zu erkennen ist. Es stellt sich daher die Frage, welchen Nutzen die Zellen unter diesen Umständen von AI haben.

Wir konnten zeigen, dass QS und DS nur Extremsituationen der gleichen zellulären Strategie darstellen (**Abb. 4**)^[8]. AI messen gleichzeitig Aspekte der Zelldichte (QS) und der räumlichen Verhältnisse (DS). Reine QS- oder DS-Situationen treten in der Realität nur selten auf.

Der Nutzen für die Zelle besteht darin, dass AI als kostengünstiger Stellvertreter für die Ermittlung der zu erwartenden Effizienz der Effektorfreisetzung fungieren. Die örtlichen Konzentrationen von AI und Effektor hängen von den gleichen Faktoren ab, nämlich der Produktion durch alle anwesenden Zellen, der Zellverteilung und dem Massentransfer in der Umgebung. Daher kann die Zelle die Effizienz der Effektorfreisetzung aus der AI-Freisetzung ableiten und dabei dreifach Kosten sparen: Die AI sind kleiner, ihre aktive Konzentration ist sehr niedrig, und es ist der Zelle möglich, mithilfe eines AI mehrere Effektoren gleichzeitig zu regulieren. Diese Strategie lässt sich als Efficiency Sensing (ES) verstehen^[8]. Eine Kommunikation und Kooperation mit anderen Zellen findet statt, wenn diese anwesend sind, ist aber nicht notwendig. Die relative Relevanz der drei Faktoren hängt dabei vom konkreten Zellumfeld ab. Die Zelle kann diese nicht unterscheiden und braucht es auch nicht. Das ES-Konzept erklärt, was die Zellen messen (Gesamteinfluss der drei Faktoren) und wozu (Effizienzabschätzung der Effektorfreisetzung).

Wichtig ist, dass Mikrokolonien die zentrale Einheit der Kooperation darstellen. Wie **Abbildung 3** zeigt, messen Zellen vor allem die AI, die von Zellen der gleichen Mikrokolonie erzeugt wurden. Dieser Effekt wird verstärkt durch die erwähnte positive Rückkopplung. Das bietet einen Schutz der Kooperation im ES gegen chemische Manipulation durch andere Arten oder zufälligen Cross-Talk. Da Mikrokolonien durch sukzessive Teilungen aus einer Ausgangszelle entstehen, sind sie weitgehend klonal, und die Koope-



ration in solchen klonalen Mikrokolonien kann durch Kin Selection evolutionär stabil sein. Aus Evolutionssicht arbeiten die Erhöhung der direkten Fitness durch optimierte Effektoreffizienz in nicht-kooperativen Situationen und die indirekte Fitness durch kooperative Produktion mit Verwandten in dieselbe Richtung. ES kann daher unter breiteren Umweltbedingungen entstehen als QS und DS.

ES wurde abgeleitet unter Berücksichtigung der komplexen natürlichen Umgebung von Bakterien, etwa auf einer Wurzeloberfläche, sowie evolutionstheoretischer Überlegungen und erlaubt ein besseres Verständnis als QS und DS, die es als Spezialfälle enthält. Die Probleme, die bei QS und DS auftreten, gelten für ES nicht oder nur abgeschwächt. ■

Literatur

- [1] Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994): Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.
- [2] Neilson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W. (1970): Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104: 313–322.
- [3] Xavier, K. B., Bassler, B. L. (2003): LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 191–197.

[4] Gantner, S., Schmid, M., Dürr, C., Schuëgger, R., Steidle, A., Hutzler, P., Langebartels, C., Eberl, L., Hartmann, A., Dazzo, F.B. (2006): In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acyl-homoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 188–194.

[5] Kreft, J.-U. (2004): Conflicts of interest in biofilms. *Biofilms* 1: 265–276.

[6] Redfield, R. J. (2002): Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10: 365–370.

[7] Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2001): N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol.* 147: 3249–3262.

[8] Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J.-U. (2007): Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 230–239.

Korrespondenzadressen:

Dr. Burkhard A. Hense
Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
Institut für Biomathematik und Biometrie – IBB
Ingolstädter Landstraße 1
D-85764 Neuherberg
burkhard.hense@gsf.de

Dr. Jan-Ulrich Kreft
Centre for Systems Biology
School of Biosciences
University of Birmingham
Birmingham B15 2TT, UK
j.kreft@bham.ac.uk

AUTOREN



(von o. li. nach u. re.)

Dr. Christina Kuttler promovierte am Lehrstuhl Biomathematik in Tübingen. Sie ist seit 2004 im IBB, Helmholtz Zentrum München, beschäftigt.
Prof. Dr. Anton Hartmann studierte Biochemie und promovierte im Bereich Mikrobiologie an der Universität Tübingen. Nach Aufhalten an den Universitäten Bayreuth und Madison, Wisconsin, leitet er die Abteilung Mikroben-Pflanzen Interaktionen (AMP) des Helmholtz Zentrum München und ist apl. Professor an der LMU München.
Dr. Michael Rothballer ist als promovierter Mikrobiologe (TU München) seit 2004 tätig in der AMP. **Prof. Dr. Johannes Müller** promovierte in Mathematik (Tübingen). Nach Aufhalten an den Universitäten Utrecht und Köln sowie der GSF, München, übernahm er 2003 eine Professur am Lehrstuhl Biomathematik der TU München. **Dr. Burkhard Hense** studierte Biologie in Bochum, promovierte an der TU München und arbeitet seit 1998 im IBB, Helmholtz Zentrum München. **Dr. Jan-Ulrich Kreft** studierte Biologie in Konstanz und Tübingen. Nach der Promotion arbeitete er an den Universitäten in Cardiff, UK, und Bonn. Seit 2007 ist er an der Universität Birmingham, UK, tätig.