

3D-Architektur von Biofilmen

Bakterielle Megastädte

REGINE HENGGE

INSTITUT FÜR BIOLOGIE/MIKROBIOLOGIE, HU BERLIN

What makes a multicellular aggregate of bacterial cells a biofilm is the presence of an extracellular polymeric matrix. Besides being protective, matrix components such as amyloid curli fibres and cellulose in *Escherichia coli* also assemble into a complex architecture that is controlled by RpoS and c-di-GMP. This confers extreme cohesion and elasticity to macrocolony biofilms. As a consequence, these biofilms behave like tissues, i. e. they buckle up into intricate morphological structures during growth.

DOI: 10.1007/s12268-015-0603-x
© Springer-Verlag 2015

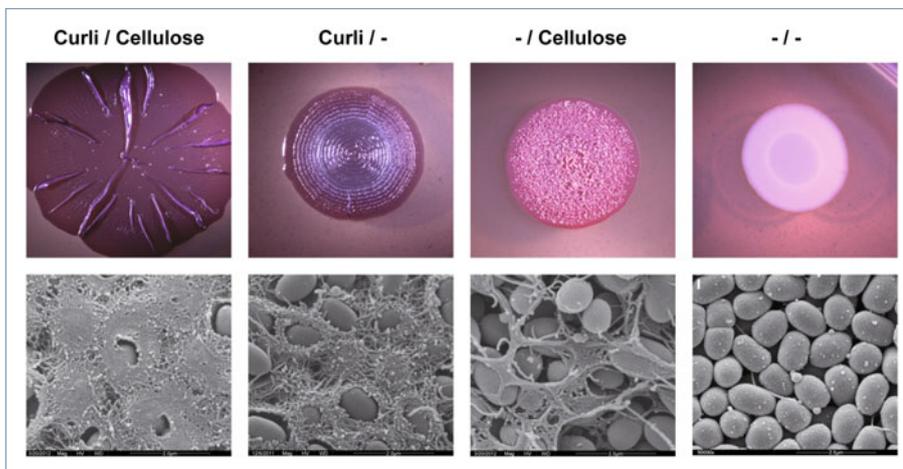
■ Wir kennen Bakterien als Erreger von gefürchteten Infektionskrankheiten sowie als *friendly bacteria* in unserem Mikrobiom – aber als geniale Baumeister von mikrobiellen „Megastädten“? In vielzelligen Aggregaten umgeben sich bakterielle Zellen mit einer selbstproduzierten extrazellulären Matrix, die ihnen Schutz vor Umweltstress, Antibiotika oder den Attacken unseres Immunsystems bietet. Daher sind Biofilme mit vielen chronischen Infektionskrankheiten assoziiert. Darüber hinaus ist die Matrix ein Baumaterial, das Biofilmen Kohäsion und Elastizität und damit gewebeähnliche Eigenschaften verleiht. Zelluläres „Gedränge“ führt

daher bei Koloniebiofilmen zur Auffaltung in makroskopisch-morphologische Muster. Diese werden im Englischen als *wrinkled*, *rugose* oder *rdar* bezeichnet (Letzteres steht für *rough, dry and red on Congo Red plates*). Sie bestehen bei näherem Hinsehen aus unterschiedlich zusammengesetzten Mustern aus langen, hohen Stegen, dicht ineinander verschlungenen Auffaltungen oder konzentrischen Kreisen (**Abb. 1**). Neue Forschungen zeigen, dass diese bakteriellen Biofilme alles andere als unstrukturierte, von Matrix umgebene Zellhaufen sind. Vielmehr liegt dieser vielfältigen Morphologie eine komplexe supra-zelluläre Architektur zugrunde, die von

Genen im Zusammenspiel mit lokalen Umweltbedingungen im Biofilm gesteuert wird [1]. Im Zentrum der regulatorischen Logistik steht dabei die generelle Stressantwort sowie der in Bakterien nahezu ubiquitäre sekundäre Botenstoff c-di-GMP, ein zyklisches Dinukleotid, das generell die Synthese von Adhäsinen und anderen Matrixkomponenten und damit die Biofilmbildung fördert [2]. Bei *Escherichia coli* sind die zugrunde liegenden molekularen Kontrollmechanismen inzwischen so gut verstanden [3], dass man nunmehr Fragen nach dem Wo und Wann der Matrixsynthese stellen kann, also nach der räumlichen und zeitlichen Regulation der dreidimensionalen Matrixarchitektur im Biofilm. Außerdem erhebt sich die Frage, weshalb Bakterien derart komplexe Makrostrukturen aufbauen.

Amyloide Fasern und Cellulose als Baumaterial

Im Gegensatz zu anderen bakteriellen Modellorganismen [4] erzeugt *E. coli* unter Standardlaborbedingungen morphologisch hochstrukturierte Makrokolonien mit nur zwei Baumaterialien in seiner extrazellulären Matrix: Amyloide Curli-Fasern und das Exopolysaccharid Cellulose stellen sozusagen das Äquivalent von Beton und Stahl auf der Mikroebene dar. In Stämmen wie dem Laborstamm K-12, der nur Curli-Fasern produziert, umgeben diese die produzierenden Zellen als dichtes, korbartiges Fasergeflecht (**Abb. 1**), das die Zellen verbindet und räumlich fixiert. Dieses Geflecht ist aber so brüchig, dass sich hinter der Wachstumszone am Rand der Kolonie Risse auftun, die bei weiterem Wachstum in den unteren Schichten zu einem konzentrisch aufgewölbten Ringmuster der ganzen Kolonie führen [5, 6]. Cellulosefasern hingegen lagern sich zu eher flächigen Formen und weitreichenden dicken Filamenten zusammen, die sich auch mit Flagellen verbinden können und den Makrokolonien hohe Elastizität verleihen. Eine Matrix, die nur aus Cellulose besteht, führt zu Makrokolonien mit unzähligen ineinander verschlungenen klei-



▲ **Abb. 1:** Matrixkomponenten und Morphologie von Makrokolonien von *Escherichia coli*-Stämmen, die Curli-Fasern und/oder Cellulose produzieren. Die Kolonien waren fünf Tage auf salzfreien LB-Agarplatten bei 28 °C gewachsen. Rasterelektronenmikroskopische Bilder zeigen die Oberflächen der Makrokolonien.

nen Auffaltungen [6]. Makrokolonien von *E. coli*-Stämmen, die beide Matrixkomponenten ausbilden, sind groß und flach (**Abb. 1 und 2**). Vereint bilden Curli-Fasern und Cellulose ein extrem belastbares Verbundmaterial, dessen Kohäsivität und Elastizität durch die präzise regulierte Menge und das Verhältnis der beiden Bestandteile bestimmt wird. Erst dieser mikrobielle „Stahlbeton“ erlaubt es dem flachen, durch weiteres Wachstum unter Spannung stehenden Zellverbund, sich ohne Brüche aufzufalten und senkrechte Leisten oder Stege in die Höhe zu schieben – mikrobielle „Wolkenkratzer“, etwa 120 Mikrometer dick und über fünf Millimeter hoch (**Abb. 1 und 2**, [1]).

Suprazelluläre Architektur von *E. coli*-Biofilmen

Sowohl amyloide Curli-Fasern als auch Cellulose binden Kongorot (CR, *Congo Red*) und diverse fluoreszierende Farbstoffe wie Thioflavin-S (TS) oder Calcofluor, die den Agarplatten zugesetzt werden können, ohne die Biofilmmorphogenese zu stören. Die durch TS ermöglichte Visualisierung der Matrix in Kryoschnitten durch *E. coli*-Makrokolonien in Kombination mit hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie (REM) [5, 6] offenbart einen klaren physiologischen Schichtenaufbau und eine überraschend komplexe Matrix-Feinarchitektur (**Abb. 2 und 3**). In den flachen Bereichen sind der äußere Rand einer *E. coli*-Kolonie sowie deren dünne untere Schicht frei von Curli-Fasern und Cellulose. Dafür befinden sich hier – also der nährstoffhaltigen Agarschicht am nächsten – stäbchenförmige, wachsende und sich teilende Zellen, die Flagellen produzieren. Durch ihre Rotation verbinden sich diese Flagellen zu einem dicht gespannten Netzwerk (**Abb. 3**). Im oberen Bereich der Makrokolonie befindet sich Matrix in unterschiedlichen Anordnungen. Ganz oben zeigen sich kleine ovoide Zellen, die von einem praktisch lückenlosen dichten Curli-Cellulose-Geflecht umgeben sind (**Abb. 3**). In der tiefer liegenden Übergangszone hingegen finden sich lange filamentöse Strukturen, die teilweise auch vertikale Ketten von Zellen hüllartig umschließen. Diese räumliche Anordnung sowie die Struktur in REM-Aufnahmen weisen auf eine Matrix hin, die vor allem aus Cellulose besteht [6]. Extrem ausgeprägt zeigt sich eine fächerförmige Verteilung dieser Cellulosefilamente in den stark gebogenen Spitzen der hohen Kolo-

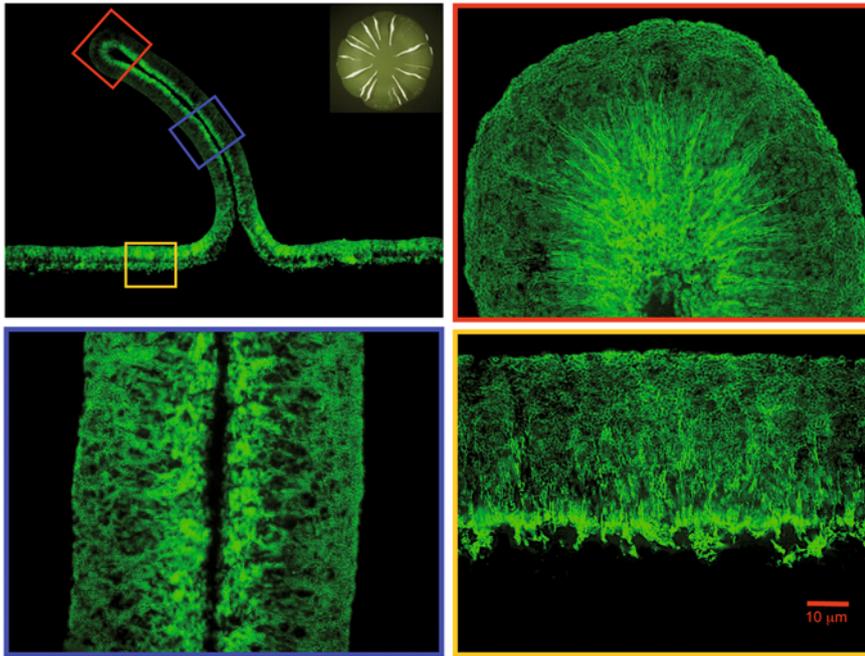
niestege. Interessanterweise ist die Matrixverteilung und -zusammensetzung im Inneren der Kolonie sehr heterogen, mit Gruppen und oft kleinen Ketten von Matrixproduzierenden und Matrix-freien Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft (**Abb. 2 und 3**).

Nährstoffgradienten und RpoS generieren die Biofilm-Raumstruktur

Bereits die unterschiedliche Zellmorphologie sowie die An- und Abwesenheit von Zellteilung entlang der vertikalen Achse durch einen Kolonieschnitt zeigen, dass wir es am äußeren Rand und in der unteren Schicht einer *E. coli*-Makrokolonie mit vegetativ wachsenden Zellen zu tun haben, während an und nahe der Oberfläche hungernde Zellen in der stationären Phase zu finden sind (**Abb. 3**). Zudem ist die Expression des wichtigen Biofilmregulators CsgD, der für die Produktion von Curli-Fasern und Cellulose benötigt wird, essenziell von der Stationärphasen-Sigma-Untereinheit RpoS (σ^S) der RNA-Polymerase (RNAP) abhängig [7, 8]. Die heterogene Zellpopulation im großen Übergangsbereich hat den Übergang in die stationäre Phase und damit zur CsgD-Expression und Matrixsynthese nur teilweise durchlaufen. Insgesamt zeigt sich, dass das räumliche Muster der physiologischen Zellzustände im Makrokoloniebiofilm im Grunde eine Rekapitulation der in klassischen Flüssigkulturen zu beobachtenden zeitlichen Abfolge von vegetativem Wachstum in die stationäre Phase hinein darstellt, in welche die Biofilm-Matrixsynthese regulatorisch integriert ist (**Abb. 4**). Dies bedeutet aber auch, dass das Konzept eines speziellen physiologischen „Biofilm-Differenzierungszustands“ [9] zumindest in dieser Art des Biofilms nicht zutreffend ist.

Ein c-di-GMP-Schalter entscheidet über die Matrixsynthese

Der sekundäre Nukleotid-Botenstoff c-di-GMP [2] spielt eine wesentliche Rolle bei der räumlichen und zeitlichen Kontrolle des Aufbaus der Matrixarchitektur im Biofilm. Neben RpoS wird auch ein hoher zellulärer c-di-GMP-Gehalt zur Stationärphasen-induzierten Expression von CsgD und der daran gekoppelten Matrixsynthese benötigt [8]. Die zelluläre c-di-GMP-Konzentration wird von antagonistisch wirkenden Diguanylatzyklasen (DGC, mit



▲ **Abb. 2:** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von vertikalen Kryoschnitten durch *Escherichia coli*-Makrokolonien, die auf Agarplatten mit Thioflavin-S (zur Matrixmarkierung) gewachsen waren (verändert nach [6]). Weitere Details siehe Text.

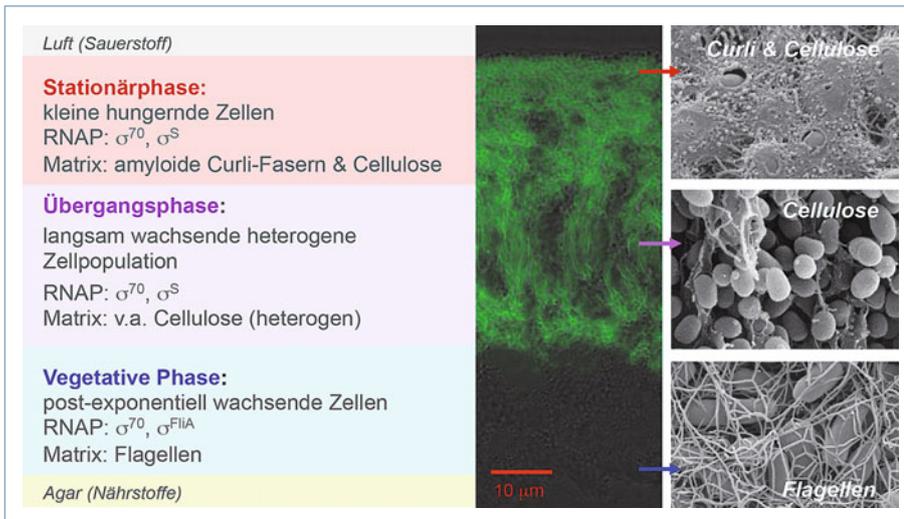
Anstieg der zellulären *c*-di-GMP-Konzentration führt. Dies erlaubt es dem Triggerenzym PdeR, *c*-di-GMP zu binden und zu spalten, wodurch seine Hemmung des DgcM-MlrA-Komplexes aufgehoben wird. DgcM synthetisiert nun ebenfalls *c*-di-GMP – eine positive Rückkopplung – und wirkt zudem als transkriptioneller Ko-Aktivator für MlrA am *csgD*-Promotor [3]. Dies führt zur Akkumulation von CsgD und somit zu Synthese und Export von Cellulose und Curli-Fasern (**Abb. 4**). Dieser *c*-di-GMP-abhängige Schalter zeigt bistabiles Verhalten [10], was die Heterogenität der CsgD-Expression und Matrixsynthese in weiten Bereichen des Makrokoloniebiofilms erklärt.

Bedeutung der Biofilmmatrix für die Physiologie und Virulenz von *E. coli*

Die dichte Matrixhülle eines Koloniebiofilms schützt vor Austrocknung, physikalischem Stress, antimikrobiellen Substanzen und Fraßfeinden, etwa räuberischen Protozoen in der Umwelt. Das Zusammenspiel von Cellulosefilamenten und amyloiden Curli-Fasern bewirkt aber auch die extreme Flachheit sowie die elastische Auffaltung des gewebeartigen Koloniebiofilms und damit eine optimierte Sauerstoffversorgung. Zudem wird so Oberflächenterrain großflächig besetzt, was die Ausbreitung stark sauerstoffabhängiger konkurrierender Spezies behindern dürfte. Schließlich sind Curli-Fasern stark entzündungsfördernd – eine Eigenschaft, die im Verbund mit Cellulose jedoch stark abgeschwächt wird. 2011 hatte der Shigatoxin-produzierende Stamm O104:H4 eine Epidemie ausgelöst [11]. Dieser Stamm besitzt eine zusätzliche, extrem stark exprimierte DGC und produziert große Mengen von Curli-Fasern auch bei 37 °C, ist jedoch Cellulose-negativ, was zu seiner starken Virulenz beigetragen haben dürfte [12].

Anti-Biofilm-Wirkstoffe

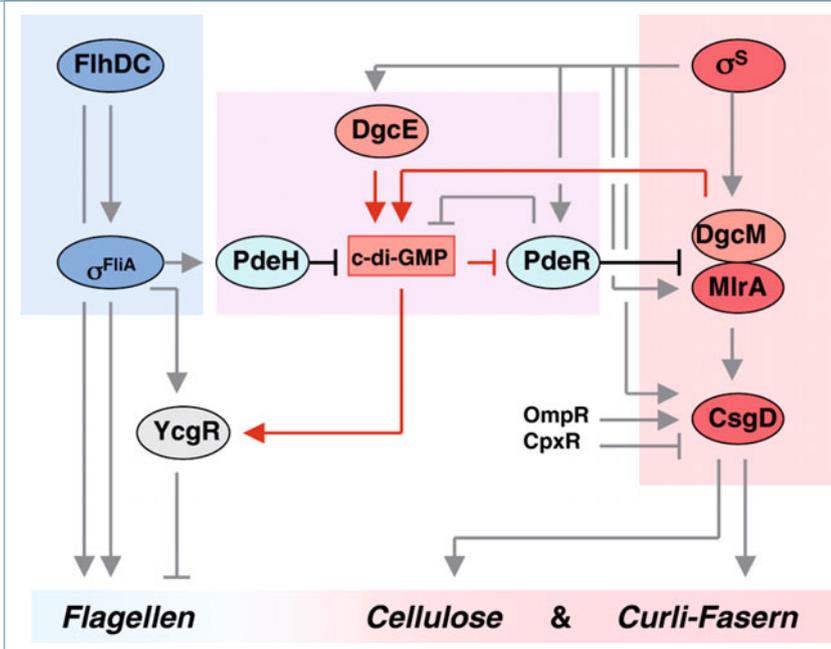
Der direkte Zusammenhang von bakterieller Biofilmbildung mit Antibiotikaresistenz und chronischen Infektionen hat dazu geführt, dass derzeit intensiv nach Anti-Biofilm-Wirkstoffen gesucht wird. Diese könnten zumindest drei für die Biofilmbildung wesentliche Prozesse verhindern: (1) die Kommunikation der Bakterien über diffusible Signalmoleküle (Quorum sensing), (2) die Aktivität der DGCs, die eine einzige Proteinfamilie darstellen, sowie (3) die Bildung von amyloiden Fasern, wie z. B. Curli, die in Biofilmen weit verbreitet sind.



▲ **Abb. 3:** Physiologische Raumordnung und Matrixverteilung entlang der vertikalen Achse durch *Escherichia coli*-Makrokolonien. Mitte: vertikaler Kryoschnitt durch eine Kolonie, deren Matrix mit Thioflavin-S angefärbt wurde (Fluoreszenz überlagert mit dem Hellfeldbild); rechts: rasterelektronenmikroskopische Nahaufnahmen entsprechend der durch Pfeile gekennzeichneten Regionen des Biofilms. RNAP: RNA-Polymerase.

GGDEF-Domänen: DgcM, DgcE) und spezialisierten Phosphodiesterasen (PDE, mit EAL-Domänen: PdeH, PdeR) bestimmt. *E. coli* K-12 besitzt zwölf DGCs und 13 PDEs, von denen einige an einem zentralen Umschaltmechanismus direkt beteiligt sind, während andere je nach Bedarf durch bestimmte Signale aktiviert werden. Die am zentralen Schalter beteiligten Proteine werden während des Übergangs in die stationäre Phase durch RpoS induziert [7, 8]. Die Schlüsselkomponente des Schalters ist das Triggere-

renzym PdeR (YciR) [3]. Dieses Protein hemmt den Proteinkomplex aus DgcM (YdaM) und dem Transkriptionsfaktor MlrA, der für die RpoS-abhängige Transkription des *csgD*-Gens benötigt wird (**Abb. 4**). In vegetativ wachsenden Zellen wird der zelluläre *c*-di-GMP-Spiegel durch die stark exprimierte PDE PdeH niedrig gehalten. In der Übergangsphase oder -zone wird jedoch die ebenfalls RpoS-induzierte DgcE (YegE) aktiv, während die Expression von PdeH abgeschaltet wird, was zu einem starken



▲ **Abb. 4:** Ein c-di-GMP-abhängiger Schalter kontrolliert die Expression des Biofilmregulators CsgD und damit die Matrixsynthese. Relevante Transkriptionsfaktoren sind blau (in vegetativen Zellen) bzw. rot (in Stationärphasenzellen) gekennzeichnet; c-di-GMP-produzierende Diguanylatzyklen sind hellrot, c-di-GMP-spaltende Phosphodiesterasen hellblau markiert. Weitere Details siehe Text.

Danksagung

Ich danke allen meinen Mitarbeiter/innen für Ihre wissenschaftlichen Beiträge, insbesondere Diego O. Serra, von dem die mikroskopischen Bilder dieses Artikels stammen. Die Projekte im Hengge-Labor werden durch den Europäischen Forschungsrat (ERC AdG 249780) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Literatur

- [1] Serra DO, Hengge R (2014) Stress responses go three-dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol* 16:1455–1471
- [2] Hengge R (2009) Principles of cyclic-di-GMP signaling. *Nat Rev Microbiol* 7:263–273
- [3] Lindenberg S, Klauck G, Pesavento C et al. (2013) The EAL domain phosphodiesterase YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signaling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J* 32:2001–2014
- [4] Hobley L, Harkins C, MacPhee CE et al. (2015) Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*, <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- [5] Serra DO, Richter AM, Klauck G et al. (2013) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio* 4:e00103–e00113
- [6] Serra DO, Richter AM, Hengge R (2013) Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol* 195:5540–5554
- [7] Weber H, Pesavento C, Possling A et al. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signaling within the σ^S network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62:1014–1034
- [8] Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N et al. (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 22:2434–2446
- [9] O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49–79

- [10] Yousef KP, Streck A, Schütte C et al. (2015) Logical-continuous modelling of post-translationally regulated bistability of curli fiber expression in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol* 9:39
- [11] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W et al. (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis* 11:671–676
- [12] Richter A, Povolotsky TL, Wieler LH et al. (2014) C-di-GMP signaling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. *EMBO Mol Med* 6:1622–1637

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Regine Hengge
 Institut für Biologie/Mikrobiologie
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Chausseestraße 117
 D-10115 Berlin
 Tel.: 030-2093-8101
 Fax: 030-2093-8102
regine.hengge@hu-berlin.de
www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/mikrobiologie/hengge

AUTORIN



Regine Hengge

1976–1986 Biologiestudium (Diplom) und Promotion an der Universität Konstanz. 1987–1988 Postdoc-Aufenthalt an der Princeton University, NJ, USA. 1994 Habilitation in Mikrobiologie und Molekularer Genetik und C2-Dozentur an der Universität Konstanz. 1998–2013 C4-Professur an der FU Berlin. Seit 2013 W3-Professur an der HU Berlin.