

Zellbiologie und Zellanalytik

Visualisierung von Mutationen auf Einzelzellebene

SARAH TÄUBER¹, MIRIAM DORMEYER², FABIAN M. COMMICHAU³, ALEXANDER GRÜNBERGER^{1, 4}

¹ MULTISCALE BIOENGINEERING, UNIVERSITÄT BIELEFELD

² MICROBIOLOGY RESEARCH, GLOBAL INNOVATION COSMETIC INGREDIENTS, SYMRISE AG, HOLZMINDEN

³ FG SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE, INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE, BTU COTTBUS-SENFTENBERG

⁴ INSTITUT FÜR BIO- UND GEOWISSENSCHAFTEN, IBG-1: BIOTECHNOLOGIE, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH

Bacterial mutations have been investigated since many years, but they remain difficult to observe directly in single cells, which limits the analysis of the underlying molecular mechanism. However, for the investigation of mutations at the level of single cells, precise analytical tools are currently developed. This article describes a workflow for visualizing mutations in single cells and lays the foundation for the quantification of bacterial mutation rates in the future.

DOI: 10.1007/s12268-020-1414-2
© Die Autoren 2020

■ Für die Entstehung der organismischen Vielfalt und für die Evolution der Organismen sind genomische Veränderungen (Mutationen) essenziell. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung (kurze Generationszeit) eignen sich Bakterien für die Untersuchung von Mutationsereignissen besonders gut. Bakterielle Mutationen werden in der Tat seit mehr als einem Jahrhundert untersucht. Da die Bakterien sehr klein sind, ist es technisch aufwendig, die Mutationen direkt in einzelnen Zellen beobachten zu können. Dies erschwert auch die Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie die Analyse der Entstehung und des Auftretens von Mutationen über die Zeit [1]. Spontanmutationsraten bei Bakterien werden seit Langem mithilfe eines „Fluktuationstests“, der erstmalig 1943 von Salvatore Luria und Max Delbrück beschrieben wurde, abgeschätzt (**Abb. 1A**, [2]). Beim Fluktuationstest werden zunächst mehrere unabhängige Bakterienpopulationen ohne Selektionsdruck kultiviert. Zur Isolation der Mutanten und zur Bestimmung der Mutationsrate werden die Bakterien auf festen Nährmedien unter selektiven Bedingungen kultiviert.

Obwohl der Fluktuationstest arbeitsaufwendig ist, stellt er eine gängige Methode dar, um Mutationsraten zu untersuchen. Alternative Ansätze für die Messung von Mutationsraten bei fehlender Selektion sind z. B. der direkte Vergleich von Genomsequenzen von Eltern und Nachkommen [3] oder die gezielte Sequenzierung von Populationen [4]. Diese Methoden sind auf höhere Organismen und große Bakterienpopulationen beschränkt und können keinen Einblick in die spontane und dynamische Natur des bakteriellen Genoms auf Einzelzellebene in Echtzeit geben. Daher bleibt die Schlüsselfrage, wie die Mutationsraten in einzelnen Zellen reguliert werden, verborgen. Trotz jahrzehntelanger Forschung beruhen die Methoden zur Messung der Mutagenese immer noch auf der Akkumulation von Mutationen über die Zeit in großen Zellpopulationen. Die Bestimmung der Mutationsrate und die Entschlüsselung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden dadurch erschwert, dass Mutationen in einzelnen Zellen nicht direkt detektiert werden können. Erste Ansätze zur Anwendung der mikrofluidischen Systeme für die Visualisierung auftre-

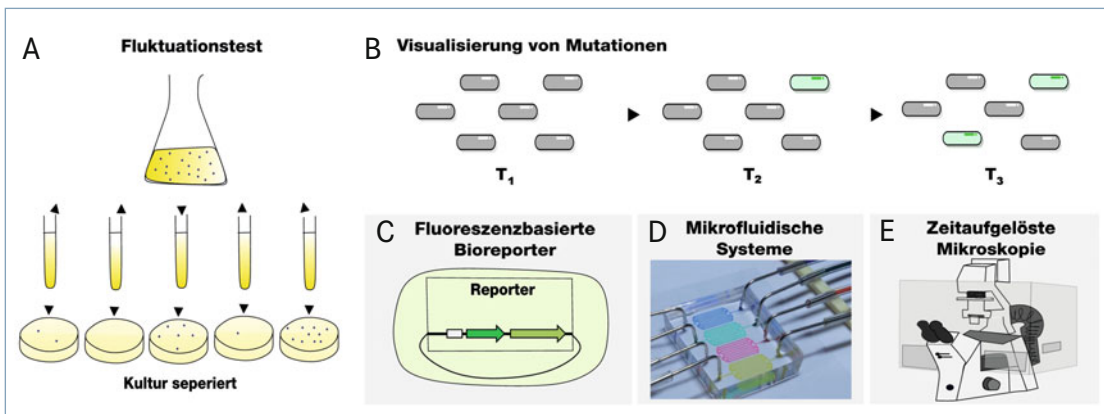
tender mikrobieller Mutationen [5–7] und die Untersuchung der Mutationsdynamik in Echtzeit [8, 9] wurden kürzlich beschrieben.

Beobachtung von Mutationen auf Einzelzellebene

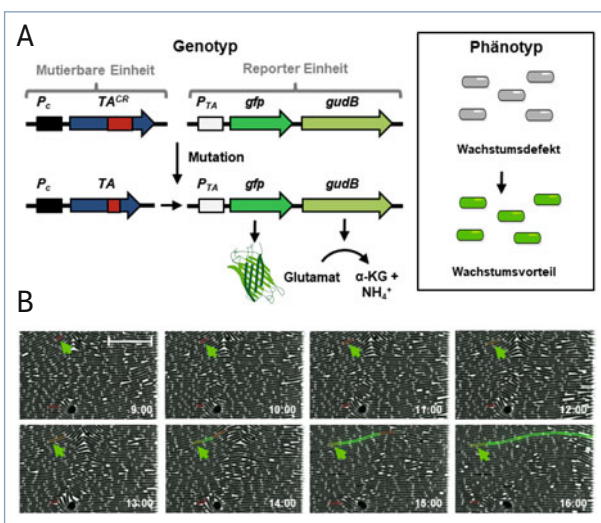
Um die Mutationen in einzelnen Zellen beobachten und die Rate bestimmen zu können (**Abb. 1B**), müssen einige molekularbiologische und technische Methoden miteinander kombiniert werden. Für die Visualisierung von spezifischen Mutationsereignissen müssen fluoreszenzbasierte Reportersysteme entwickelt werden. Dies ermöglicht die Visualisierung von Mutationen in Echtzeit (**Abb. 1C**). Für die Kultivierung und Analyse von Einzelzellendynamiken kommen neue, mikrofluidische Kultivierungsplattformen zum Einsatz (**Abb. 1D**, [10]). In Kombination mit zeitaufgelöster Mikroskopie können sowohl das Wachstum als auch fluoreszenzgekoppelte Vorgänge einzelner Zellen visualisiert werden (**Abb. 1C–E**). Die Vorteile dieser Systeme sind unter anderem konstante und definierte Nährstoffbedingungen und ein hoher Grad an Parallelisierung der Kultivierungskammern, wodurch das Screening von seltenen biologischen Ereignissen ermöglicht wird. Darüber hinaus können mit diesen Systemen morphologische Veränderungen und zelluläre Interaktionen im Hochdurchsatz untersucht werden.

Visualisierung spezifischer Mutationsereignisse in einem Modellbakterium

Als Modellsystem diente das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, weil es genetisch einfach manipulierbar und handhabbar ist. Direkte und kurze Sequenzwiederholungen (*tandem repeats*) sind Mutations-hot spots, die in den Genomen aller Organismen, einschließlich *B. subtilis*, vorkommen. *Tandem repeats* kommen sowohl außerhalb als auch innerhalb von Genen vor. Aufgrund der genetischen Instabilität der Tandemwiederholungen kann ihre Länge variieren, wodurch die Expressionsstärke eines Gens und auch die Funktion des codier-



▲ **Abb. 1:** Technische Komponenten für die Untersuchung von Mutationsraten auf Einzelzellebene. **A**, Schematische Darstellung des Fluktuationstests, bei dem zunächst mehrere Bakterienkulturen unabhängig voneinander unter nicht-selektiven Bedingungen kultiviert werden. Verdünnungen der Kulturen werden auf einem bestimmten Selektivmedium verteilt, um die Häufigkeit der Mutation, welche Wachstum unter den selektiven Bedingungen erlaubt, zu ermitteln. **B**, Visualisierung einer Mutation mithilfe eines fluoreszenzbasierten Reportersystems. Die Anreicherung fluoreszierender Zellen in der Zellpopulation weist auf das Auftreten einer bestimmten Mutation hin. **C**, Für die Visualisierung einer bestimmten Mutation werden fluoreszenzbasierte Reportersysteme benötigt. **D**, Mikrofluidische Systeme ermöglichen die Einzelzellkultivierung der mit den Reportersystemen ausgestatteten Bakterien. **E**, Die Mutationsereignisse können mittels zeitaufgelöster Mikroskopie visualisiert werden.



▲ **Abb. 2:** Überblick über das Mutationsreportersystem. **A**, Schematische Darstellung des Reportersystems zur Visualisierung von Mutationen, das aus einer mutierbaren Einheit und einer Reportereinheit besteht (Details siehe Text). **B**, Wachstum von *Bacillus subtilis* in Komplexmedium zwischen neun und 16 Stunden in einer mikrofluidischen Kammer. Zellen, die die Glutamatdehydrogenase *GudB* nicht bilden, haben einen Wachstumsdefekt, weil das im Medium befindliche Glutamat nicht abgebaut werden kann. Wird *GudB* gebildet, so haben die Zellen einen Wachstumsvorteil, weil Glutamat als Nährstoffquelle genutzt werden kann. Grüne Pfeile zeigen mutierte Zellen. Skalierung: 15 μ m (modifiziert aus [5], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

ten Proteins beeinflusst werden kann. Für die Visualisierung der *tandem repeat*-Mutagenese entwickelten wir ein fluoreszenzbasiertes Reportersystem, welches aus einer mutierbaren Einheit und einer Reportereinheit besteht (**Abb. 2A**, [5]). Die mutierbare

hydrogenase, die von *B. subtilis* für die Verwertung von Glutamat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle benötigt wird. Die mutierbare Einheit und die Reportereinheit wurden stabil in das Genom von *B. subtilis* integriert. Bei der Kultivierung des *B. subtilis*-Stamms

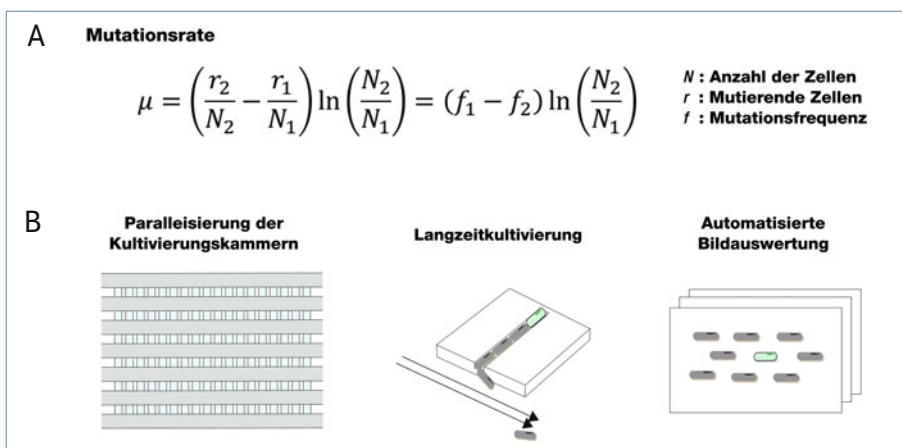
kann spontan eine neun Basenpaare lange Einheit der Tandemwiederholung herausgeschnitten werden. Die mutierten Zellen beginnen zu fluoreszieren, weil das „dekryptifizierte“ *TA*-Gen für einen funktionalen Transkriptionsaktivator codiert, welcher die Transkription der Reportereinheit ermöglicht. Wenn sich Glutamat im Nährstoffmedium befindet, dann reichern sich die mutierten und fluoreszierenden Bakterien an, weil sie einen Wachstumsvorteil haben. Die gebildete Glutamatdehydrogenase spaltet das

Einheit besteht aus einem konstitutiv aktiven Promotor (P_c), der die Expression eines kryptischen Gens antreibt. Ein Gen wird als „kryptisch“ bezeichnet, wenn es das Potenzial hat, für eine bestimmte Funktion zu codieren, für die Funktionsausübung aber ein Mutationsereignis erforderlich ist. Im Fall des Reportersystems codiert das kryptische Gen für einen inaktiven Transkriptionsaktivator (TA^{CR}), das sich in dem Bereich des Gens, der für die DNA-bindende Domäne codiert, eine perfekte 18 Basenpaare lange Tandemwiederholung befindet. Die Reportereinheit besteht aus einem *TA*-abhängigen Promotor (P_{TA}), welcher die Expression des *gfp*-Fluoreszenz-Gens und des *gudB*-Gens antreibt. Das *gudB*-Gen codiert für eine katabol aktive Glutamatde-

Glutamat in die Komponenten α -Ketoglutarat und Ammonium, welche verwertet werden. Um das Mutationsereignis auf Einzelzellebene zu visualisieren, wurde der *B. subtilis*-Stamm mit dem Reportersystem über einen Zeitraum von 18 Stunden in einem mikrofluidischen System kultiviert. In einigen Kultivierungskammern konnte die Entstehung von fluoreszierenden Zellen detektiert werden. Es wurde auch beobachtet, dass die Nachkommen der ersten fluoreszierenden Zellen einen Wachstumsvorteil haben. Es handelte sich bei den fluoreszierenden Bakterien also um Mutanten, die eine neun Basenpaare lange Einheit der Tandemwiederholung in dem TA^{CR} -Gen herausgeschnitten hatten. Mit dem hergestellten Reportersystem konnte zum ersten Mal die Mutagenese einer Tandemwiederholung auf Einzelzellebene in einem mikrofluidischen Kultivierungssystem visualisiert werden.

Mikrobielle Mutationsratenbestimmung – ein Blick in die Zukunft

Zur genauen Bestimmung der Raten spezifischer Mutationsereignisse auf Einzelzellebene müssen zahlreiche Herausforderungen gemeistert werden. Die Mutationsrate gibt die Wahrscheinlichkeit einer Zelle an, im exponentiellen Wachstum zu mutieren. Sie kann anhand der in **Abbildung 3A** gezeigten Formel berechnet werden [11]. Da es sich um einen stochastischen Prozess mit sehr niedrigen Häufigkeiten handelt, müssen die Einzelzellkultivierungsplattformen und



▲ **Abb. 3:** Überblick über die Berechnung der Mutationsrate und die Optimierung der technischen und biologischen Systeme. **A**, Formel zur Bestimmung der Mutationsrate mithilfe der mutierten Zellen r und der gesamten Anzahl der Zellen N . **B**, Herausforderungen bei der Bestimmung der Mutationsrate durch mikrofluidische Einzelzellensysteme. Durch Parallelisierung lassen sich viele Zellen gleichzeitig kultivieren. Mittels Langzeitkultivierung in Kombination mit einer automatisierten Bildauswertung können seltene Mutationsereignisse visualisiert werden.

der Workflow weiterentwickelt werden (**Abb. 3B**). Wichtig ist, dass eine große Anzahl von Zellen betrachtet werden kann. Dies kann durch einen hohen Grad an Parallelisierung erreicht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Langzeitkultivierung. So sollte der Zeitraum zwischen N_1 und N_2 möglichst lang sein, da bestimmte Mutationsereignisse nur sehr selten auftreten. Die Auswertung der mikroskopischen Bilder für die Bestimmung der Mutationsraten ist eine große Herausforderung, da gegenwärtige Bildauswertetools auf andere Parameter ausgerichtet sind.

Zusammenfassung und Ausblick

Ein mikrofluidisches Kultivierungssystem für die Visualisierung einer bestimmten Mutationsart wurde erfolgreich etabliert. Die Mutation konnte mittels zeitaufgelöster Mikroskopie visualisiert werden. Für eine verlässliche quantitative Bestimmung der Raten unterschiedlicher Mutationen auf Einzelzellebene müssen jedoch sowohl die technischen als auch die biologischen Methoden optimiert und zu einem Workflow integriert werden. Dies legt die Grundlage für eine verlässliche qualitative wie auch quantitative Untersuchung von Mutationen auf Einzelzellebene.

Danksagung

Wir bedanken uns herzlichst bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Multiscale Bioengineering (Universität Bielefeld und Forschungszentrum Jülich GmbH) und Synthetische Mikrobiologie (BTU Cottbus-Senften-

berg) für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit. Der Max-Buchner-Forschungsstiftung (MBFSt: 3720 und 3381) danken wir für die finanzielle Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Foster PL (2006) Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods Enzymol* 409:195–213
- [2] Luria SE, Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491–511
- [3] Halligan DL, Keightley PD (2009) Spontaneous mutation accumulation studies in evolutionary genetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:151–172
- [4] Jee J, Rasouly A, Shamovsky I et al. (2016) Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. *Nature* 534:693–696
- [5] Dormeyer M, Lenters S, Ballin P et al. (2018) Visualization of tandem repeat mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *DNA Repair* 63:10–15
- [6] Tomanek I, Grah R, Lagator M et al. (2020) Gene amplification as a form of population-level gene expression regulation. *Nat Ecol Evol* 4:612–625
- [7] Robert L, Ollion J, Elez M (2019) Real-time visualization of mutations and their fitness effects in single bacteria. *Nat Protoc* 14:3126–3143
- [8] Robert L, Ollion J, Robert J et al. (2018) Mutation dynamics and fitness effects followed in single cells. *Science* 359:1283–1286
- [9] Uphoff S (2018) Real-time dynamics of mutagenesis reveal the chronology of DNA repair and damage tolerance responses in single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E6516–E6525
- [10] Grünberger A, Probst C, Helfrich S et al. (2015) Spatiotemporal microbial single-cell analysis using a high-throughput microfluidics cultivation platform. *Cytometry A* 87:1101–1115
- [11] Rosche WA, Foster PL (2000) Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20: 4–17

Funding: Open Access funding provided 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:

Jun.-Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger
Multiscale Bioengineering
Technische Fakultät
Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25
D- 336 15 Bielefeld
alexander.gruenberger@uni-bielefeld.de

AUTOREN



Sarah Täuber

2013–2018 Physik- und Biophysikstudium an der Universität Bielefeld; dort seit 2018 Promotion an der Technischen Fakultät in der Arbeitsgruppe „Multiscale Bioengineering“ von Jun.-Prof. Dr. A. Grünberger.



Miriam Dormeyer

2009–2014 Biologiestudium und 2017 Promotion in der Allgemeinen Mikrobiologie an der Universität Göttingen. Seit 2018 Microbiology Research Scientist der Global Innovation Cosmetic Ingredients, Symrise AG, Holzminden.



Fabian M. Commichau

1997–2003 Biologiestudium an der RWTH Aachen. 2006 Promotion, 2006–2008 Postdoktorand an der Universität Göttingen. 2008–2009 Postdoktorand in Basel, Schweiz. 2009–2011 DSM Nutritional Products Ltd., Grenzach-Wyhlen/Kaiseraugst, Schweiz. 2011–2019 Gruppenleiter an der Universität Göttingen. 2015 Habilitation. Seit 2019 W3-Professor für Synthetische Mikrobiologie, BTU Cottbus-Senftenberg.



Alexander Grünberger

2004–2010 Biogenieurstudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). 2010–2015 Promotion am Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1) des Forschungszentrums Jülich GmbH in der Arbeitsgruppe „Microscale Bioengineering“ und der RWTH Aachen, dort 2015–2017 Postdoktorand. Seit 2017 W1-Professor für Multiscale Bioengineering an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld.