

Methoden der Zellbiologie

Gezielte Zellsortierung in der Einzelzellgenomik

MORGAN S. SOBOL, ANNE-KRISTIN KASTER
 INSTITUT FÜR BIOLOGISCHE GRENZFLÄCHEN 5, KARLSRUHER INSTITUT
 FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

Single cell genomics (SCG) can provide reliable context for assembled genome fragments on the level of individual prokaryotic genomes and has rapidly emerged as an essential complement to cultivation-based and metagenomics research approaches. Targeted cell sorting approaches, which enable the selection of specific taxa by fluorescent labeling, compatible with subsequent single cell genomics offers an opportunity to access genetic information from rare biosphere members which would have otherwise stayed hidden as microbial dark matter.

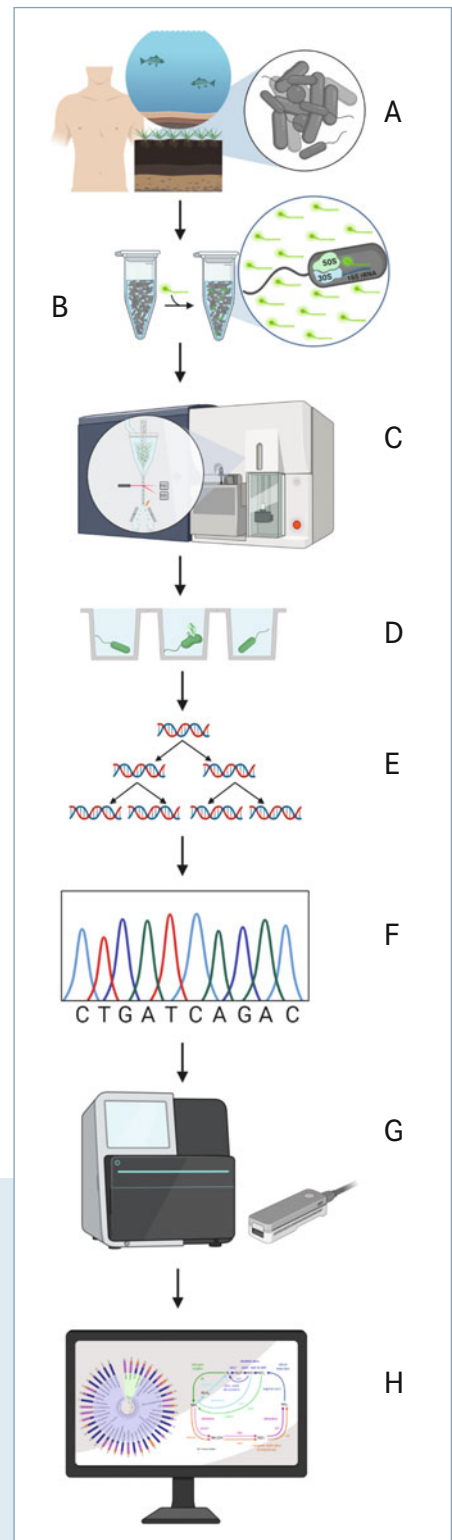
DOI: 10.1007/s12268-021-1569-5
 © Die Autorinnen 2021

Die Mehrheit aller Mikroorganismen ist hinsichtlich ihrer Phylogenie und Funktion unerforscht, wobei schätzungsweise 99 Prozent aller mikrobiellen Spezies nicht in axenischen Kulturen vorliegen. Diese nicht kultivierten Mikroorganismen werden oft als „mikrobielle dunkle Materie“ bezeichnet. Kultivierungsunabhängige *omics*-Ansätze deuten darauf hin, dass diese Organismen jedoch in ihren jeweiligen Habitaten aktiv sind und einige sogar das Potenzial für zukünftige biotechnologische Anwendungen hätten [1]. Bioinformatische Assemblierung und das *binning* waren bisher die Methode der Wahl, um Genome von noch nicht kultivierbaren Mikroorganismen aus Metagenomen zusammensetzen (*metagenome assembled genomes*, MAGs). Leider kann die Genomrekonstruktion für Mikroben mit

hoher genomischer Heterogenität auch Konsensgenome eng verwandter taxonomischer Gruppen anstelle unterschiedlicher individueller Genomen erzeugen. Dieses Problem tritt insbesondere bei Mikroorganismen mit geringer Abundanz in einem Habitat auf, da die Qualität der Genomrekonstruktion weitgehend von der Sequenzabdeckung für die Assemblierung sowie dem auf der Abdeckungskovarianz basierenden *binning* abhängig ist [2]. Die Untersuchung niedrig abundanter Spezies wird daher oft unrentabel.

Eine Zelle – ein Genom

Die Einzelzellgenomik (*single cell genomics*, SCG) hat sich als innovative Methode erwiesen, um die Nachteile der Genomrekonstruktion aus Metagenomen zu überwinden. Die



► **Abb. 1:** Arbeitsschritte der gezielten Zellsortierung in Kombination mit *single cell genomics* (SCG). **A,** Proben, die nicht sofort analysiert werden, müssen in Gegenwart eines Kryoprotektors tiefgefroren werden, um die Integrität der Zelle und ihrer Nukleinsäuren zu bewahren. **B,** Zellen können statt einer unspezifischen Färbung gezielt mit phylogenetisch spezifischen Sonden durch eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ohne Fixierung und in Lösung markiert werden. **C,** Die Isolierung der einzelnen Zelle erfolgt typischerweise durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) in 384 Multi-Well-Platten. **D,** Danach werden die einzelnen Zellen lysiert, um ihre DNA freizusetzen. **E,** Da eine typische prokaryotische Zelle nur wenige Femtogramm (fg) DNA enthält, ist eine Amplifikation um einen Faktor von ca. 10^6 erforderlich. **F,** Nach der Amplifikation wird mittels PCR gescreent, gefolgt von einer Sanger-Sequenzierung. **G,** Danach werden die *single amplified genomes* (SAGs) sequenziert. **H,** Bioinformatische Pipelines führen die Assemblierung, das *open reading frame* (ORF)-Calling und die Annotation der Gene sowie die Rekonstruktion von Stoffwechselwegen und Genvergleiche durch. © BioRender.com.

Technik ermöglicht die direkte Separation einzelner Zellen, gefolgt von der Sequenzierung und Assemblierung ihrer individuellen Genome und besteht aus einer Reihe von integrierten Prozessen (**Abb. 1**, [3]). Seit ihrer ersten Anwendung bei Prokaryoten im Jahr 2005 hat sich die Einzelzellgenomik zu einem leistungsfähigen Werkzeug entwickelt. Eine zunehmende Anzahl von *single amplified genomes* (SAGs) ist in öffentlichen Datenbanken wie der Genomes OnLine Database (GOLD) hinterlegt (Stand Februar 2021 bereits 8.717 SAGs). Der Erfolg der Genomrekonstruktion aus einzelnen Zellen kann jedoch stark variieren – von null Prozent bis zu einem kompletten Genom. Der konventionelle SCG-Workflow erfordert eine unspezifische Färbung der mikrobiellen Populationen vor der Zellsortierung [4]. Für die Genomrekonstruktion niedrig-abundanter Mikroorganismen ist das ein Problem, da diese statistisch schlicht selten vorkommen. Wie die Metagenomik war SCG daher kein kosteneffizienter Ansatz, um gering abundante Mikroorganismen zu untersuchen.

Die Guten ins Töpfchen, die Schlechten ins Kröpfchen

Kürzlich ist es uns gelungen, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit einer gezielten Zellsortierung zu koppeln, um Genome von niedrig abundanten Mikroorganismen aus einer komplexen Gemeinschaft zu sequenzieren (**Abb. 1**, [5]). FISH ist eine etablierte Methode für die spezifische Markierung von Bakterien und Archaea aus komplexen Proben und einfach anzuwenden. Normalerweise erfordert die Fluoreszenzmarkierung jedoch Fixierungsmittel wie Paraformaldehyd, um das Fluoreszenzsignal zu erhöhen, da es die Permeabilität der Zellmembran erhöht und damit das Eindringen der fluoreszenzmarkierten Sonde ermöglicht. Da das Verfahren jedoch die Zellwand schwächt, kann es während des Sortiervorgangs zur Lyse der markierten Zellen kommen, noch bevor diese die Kavität der Platte erreicht haben. Außerdem kompromittiert Paraformaldehyd die Downstream-Prozesse der SCG, nämlich die Amplifikation der genomischen DNA. Wir haben nun ein fixierungsfreies FISH-Protokoll ohne Paraformaldehyd in Lösung entwickelt, das die Zielzellen während des Sortiervorgangs intakt lässt und die Amplifizierung der Einzelzell-DNA erlaubt. Die Fluoreszenzsignale der Zellen

sind außerdem für Mehrfachsortierungen ausreichend hoch (**Abb. 2**). Dies wird durch längere Hybridisierungszeiten und höhere Sondenkonzentrationen erreicht, um das Problem der geringen Zellmembranpermeabilität zu überwinden, wenn keine zusätzlichen Fixier- und Lysiermittel verwendet werden können.

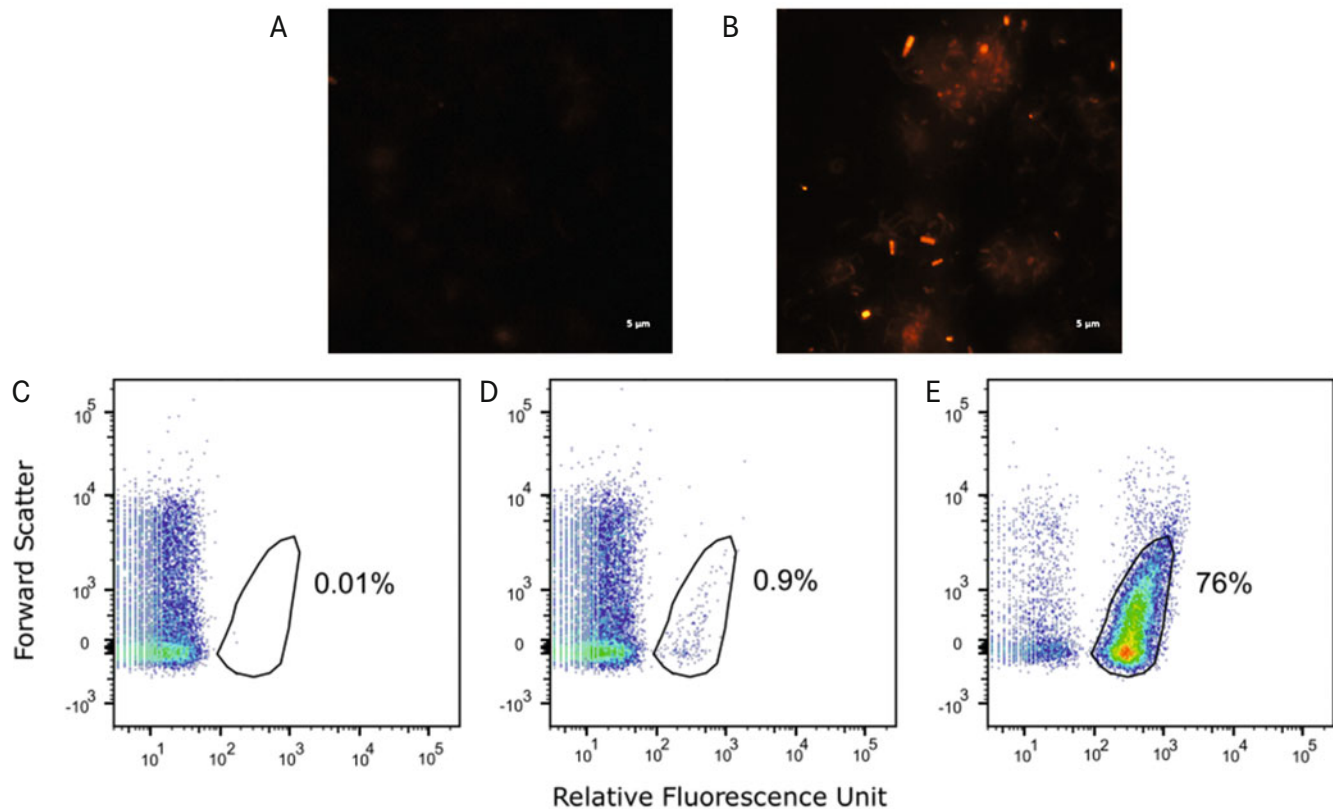
In unserer Studie konnten über gezielte Zellsortierung Chloroflexi, die weniger als ein Prozent der gesamten bakteriellen Gemeinschaft in einer Umweltprobe ausmachten, angereichert und dann im Hochdurchsatz einzeln sortiert werden. Das Verfahren ermöglichte die Gewinnung von über 40 (Teil-)Genomen unterschiedlicher Chloroflexi-Spezies. Dies ist um mindestens einen Faktor zehn höher, als statistisch in dieser Probe mit der klassischen SCG zu erwarten gewesen wäre. Im Vergleich dazu konnten aus dem Metagenom der gleichen Probe lediglich zwei MAGs gebannt werden. Unter den SAGs waren daher auch Genome vieler Spezies des Phylums Chloroflexi, die aus dem Metagenom nicht rekonstruiert werden konnten. Des Weiteren konnten SAGs, die aufgrund ihrer Sequenz derselben Spezies zugeordnet werden konnten, selektiv kombiniert und damit die Rate der Genomrekonstruktion verbessert werden. Insgesamt haben wir nach der bioinformatischen Analyse 19 SAGs erhalten, die mindestens 17 Spezies aus mindestens 5 verschiedenen Chloroflexi-Klassen zugeordnet werden konnten. Die Studie hat gezeigt, dass eine gezielte Zellsortierung in Kombination mit SCG und Metagenomik ein vielversprechender Ansatz für die Analyse von gering abundanten Mikroorganismen ist.

Die Zukunft ist hell

In Zukunft könnten auch andere FISH-Verfahren, wie Hybridisierungskettenreaktion (HCR)-FISH, schwache Signale überwinden, die auftreten, wenn sich die Zellen in einem Zustand geringer Aktivität befinden, wie es bei den meisten Proben aus oligotrophen Umgebungen der Fall ist [6]. In der jüngeren Vergangenheit wurde auch eine funktionsgetriebene SCG propagiert, wobei Zellen auf der Grundlage eines bestimmten funktionellen Merkmals oder Phänotyps ausgewählt werden. Einige dieser Studien haben wichtige ökologische und biotechnologische Erkenntnisse geliefert. So konnte z. B. mit genspezifischen Markierungen (RING-FISH) ein bisher nicht kultivierbarer Methanoxidierer sortiert werden, bei dem

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Epifluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Analyse von markierten Zellen mittels FISH-Verfahren ohne Fixierung und in Lösung. **A,** Negativkontrolle der Umweltprobe ohne Sonden. **B,** FISH-markierte Chloroflexi-Zellen in der Umweltprobe. **C,** FISH-markierten Chloroflexi-Zellen in einer Mischkultur mit 99 % *Escherichia coli*. **D,** Erste gezielte Sortierung mittels FACS. **E,** Anreicherung der markierten Zellen.

das spezifische Methanmonooxygenase-Gen bekannt war, nicht aber die 16S rRNA [7]. Ohne vorherige Kenntnis der Physiologie sind diese Methoden jedoch schwierig umzusetzen. Die derzeitigen Einschränkungen bezüglich Signalstärke, Spezifität der Substratanaloga und Quantifizierung der Aktivitätsraten schränken ihren breiten Einsatz bisher ein und müssen für Hochdurchsatzanwendungen weiter verbessert werden [8].

Danksagung

Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter der Projektnummer 320579085 gefördert. ■

Literatur

- [1] Solden L, Lloyd K, Wrighton K (2016) The bright side of microbial dark matter: Lessons learned from the uncultivated majority. *Curr Opin Microbiol* 31: 217–226
- [2] Vollmers J, Wiegand S, Kaster AK (2017) Comparing and evaluating metagenome assembly tools from a microbiologist's perspective – not only size matters! *PLoS One* 12: 1–31
- [3] Rinke C, Lee J, Nath N et al. (2014) Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nat Protoc* 9: 1038–1048
- [4] Kaster AK, Sobol MS (2020) Microbial single-cell omics: the crux of the matter. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 8209–8220
- [5] Dam HT, Vollmers J, Sobol MS et al. (2020) Targeted cell sorting combined with single cell genomics captures low abundant microbial dark matter with higher sensitivity than metagenomics. *Front Microbiol* 11: 1377

- [6] Grieb A, Bowers RM, Oggerin M et al. (2020) A pipeline for targeted metagenomics of environmental bacteria. *Microbiome* 8: 21
- [7] Pratscher J, Vollmers J, Wiegand S et al. (2018) Unravelling the identity, metabolic potential and global biogeography of the atmospheric methane-oxidizing upland soil cluster α . *Environ Microbiol* 20: 1016–1029
- [8] Hatzenpichler R, Krukenberg V, Spietz RL, Zay ZJ (2020) Next-generation physiology approaches to study microbiome function at single cell level. *Nat Rev Microbiol* 18: 241–256

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 befügen 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. Ann-Kristin Kaster
 Institut für Biologische Grenzflächen 5
 Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
 Hermann von Helmholtz Platz 1
 D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen
 anne-kristin.kaster@kit.edu

AUTORINNEN



Morgan Sobol

2013–2016 B.Sc. Biologie und 2016–2018 M.Sc. Meeresbiologie an der Texas A&M University, Corpus Christi, USA. Seit 2019 Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A.-K. Kaster.



Anne-Kristin Kaster

2007 Diplom in Chemie, Universität Marburg. 2011 Promotion, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg. 2011–2014 Postdoc, Stanford University, CA, USA. 2014–2017 Nachwuchsgruppenleiterin Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig. Seit 2017 W3-Professorin und Institutsleiterin am KIT.