

Durchmusterungstechnologie Screening

Durchflusszytometrie zum Auffinden verbesserter und neuer Enzyme

FRANK NIEHAUS¹, MILAN BLANUSA², ULI SCHWANEBERG³

¹B.R.A.I.N. AG, ZWINGENBERG

²JACOBS UNIVERSITÄT BREMEN UND 4-ANTIBODY AG, JENA

³LEHRSTUHL FÜR BIOTECHNOLOGIE, RWTH AACHEN

Flow cytometry screening systems in emulsions offer a throughput (up to 10^8) that would enable novel strategies in directed protein evolution (e. g. with high mutational loads) and enzyme discovery in metagenomes (hit rates < 1 in 10^5). A main challenge which hampers a routine use of flow cytometry is the lack of suitable screening assays. This article highlights the potential of flow cytometry to improve a monooxygenase with high mutational loads and to discover novel enzymes in metagenomes.

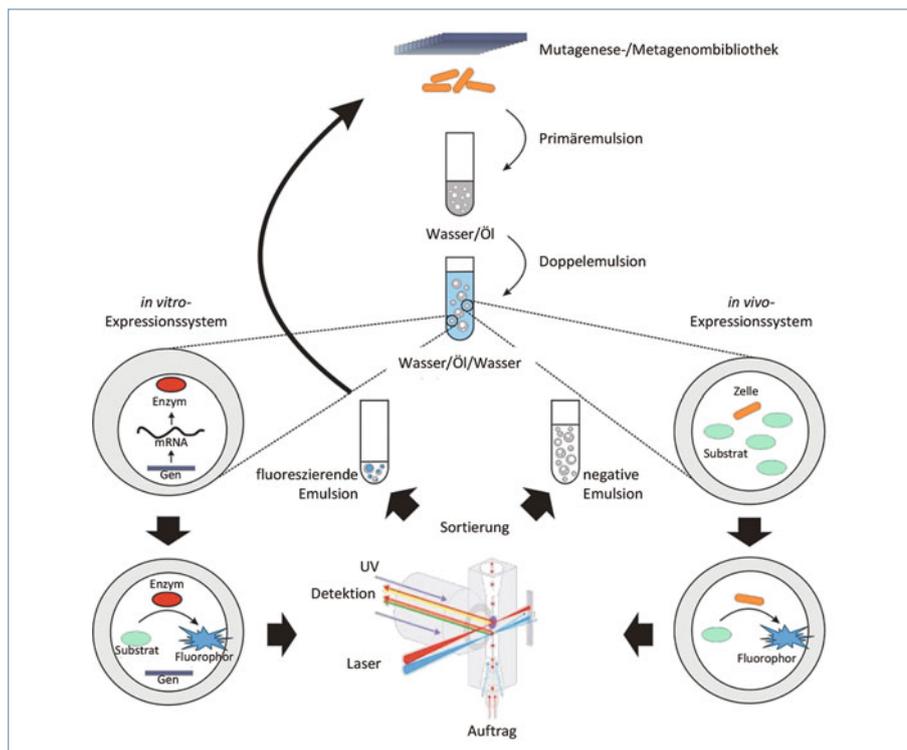
DOI: 10.1007/s12268-013-0271-7
© Springer-Verlag 2013

Die Zugänglichkeit der Diversität von komplexen mikrobiellen Lebensgemeinschaften lässt den Datenraum mikrobieller Gensequenzen („Metagenom“) aufgrund technologischer und methodischer Innovationen in der Sequenzieretechnologie exponentiell

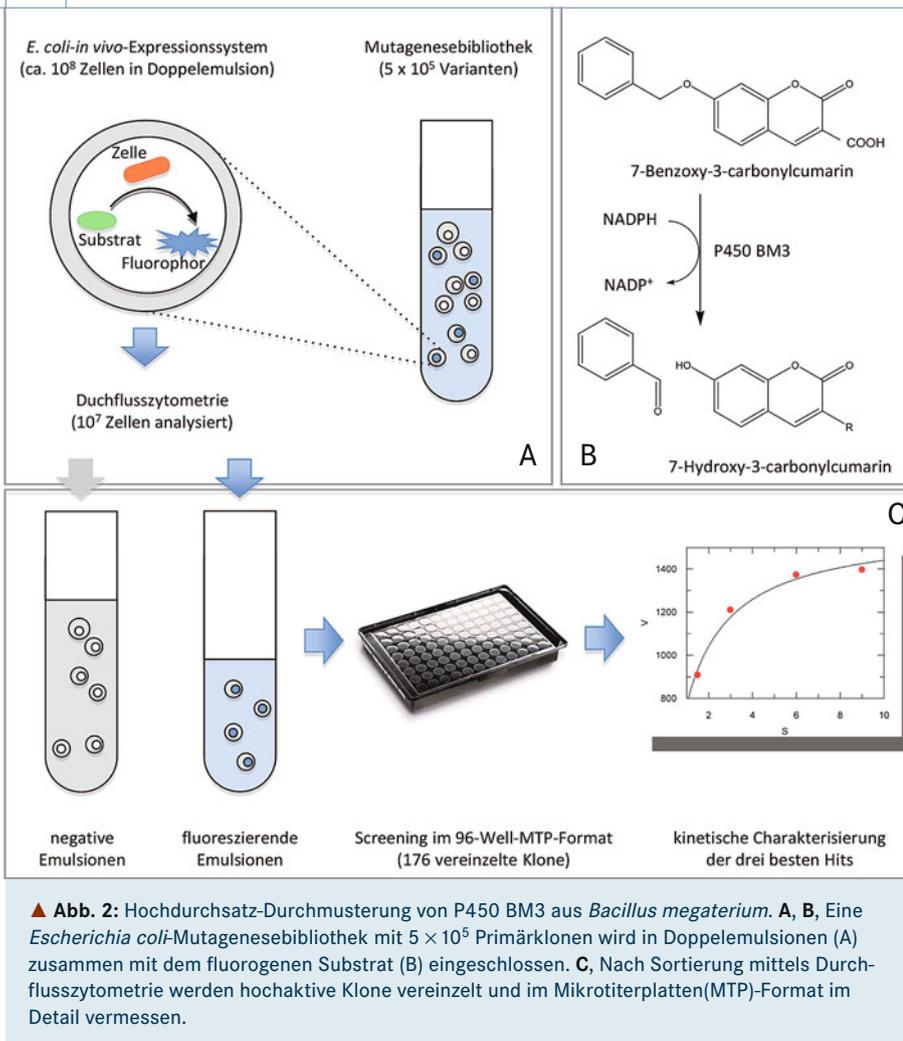
ansteigen. Die Suche nach Enzymen und Biokatalysatoren für den Einsatz in der Weißen (industriellen) Biotechnologie ist mittlerweile weder durch eine solche Datenaufnahme noch durch den Zugang zu entsprechenden Habitaten oder die synthetische Darstellung

auf Basis von *in silico*-Daten limitiert. Engpässe entstehen vielmehr infolge von im Durchsatz limitierten Durchmusterungstechnologien. Dies trifft z. B. für Metagenombibliotheken zu, in denen die Hitrate oftmals unter einem Kandidaten pro 100.000 Klonen liegt. Gleiches gilt für gelenkte Evolutionsexperimente, bei denen eine hohe Mutagenesefrequenz oftmals zu Populationen mit weniger als fünf Prozent aktiven Klonen führt. Standard-Mikrotiterplatten- und Agarplatten-Nachweissysteme können in diesen Fällen für die Durchmusterung nicht mehr zielführend eingesetzt werden.

Die Durchflusszytometrie stellt eine Hochdurchsatz-Durchmusterungstechnologie dar, mit der Genbanken und Variantenbibliotheken mit bis zu 10^8 Klonen innerhalb eines Tages durchgemustert werden können [1]. Dies stellt zwar trotzdem nur einen Bruchteil der theoretisch möglichen Varianten eines Enzyms dar, erlaubt aber mit einem zentralen Dogma der gelenkten Evolution zu brechen, nach dem Enzyme optimalerweise mit einer zur Natur vergleichbaren Strategie von ein bis zwei Aminosäureaustauschen pro Mutageneseexperiment zu verbessern sind. Die Entwicklung einer Durchflusszytometrieteknik mittels Emulsions-Mikrokompartimentierung erlaubt eine Vordurchmusterung von Variantenbibliotheken mit einer hohen Mutationsrate. Im Gegensatz zu einer niedrigen Mutagenesefrequenz besteht hierbei die Möglichkeit, synergistische Effekte zwischen einzelnen Mutationen zu erzielen. So



◀ **Abb. 1:** Vorgehensweise zum Auffinden verbesserter Varianten und neuartiger Enzyme mittels Durchflusszytometrie-Durchmusterung in Mikrokompartimenten (ausgehend von einer Enzymvarianten- und Metagenombibliothek). Im ersten Schritt werden Bibliotheken in Wasser-in-Öl- (Wasser/Öl, Primäremulsion) und anschließend in Wasser/Öl/Wasser (Doppelemulsion)-Mikrokompartimente enkapsuliert, wobei dies zellfrei (links) oder *in vivo* (rechts) möglich ist. Die Herstellung der Doppelemulsionen ist gerätetechnisch für die anschließende Sortierung mittels Durchflusszytometrie nötig, die über die Detektion eines Fluoreszenzsignals erfolgt.



▲ **Abb. 2:** Hochdurchsatz-Durchmusterung von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium*. **A, B,** Eine *Escherichia coli*-Mutagenesebibliothek mit 5×10^5 Primärklonen wird in Doppemulsionen (**A**) zusammen mit dem fluorogenen Substrat (**B**) eingeschlossen. **C,** Nach Sortierung mittels Durchflusszytometrie werden hochaktive Klone vereinzelt und im Mikrotiterplatten(MTP)-Format im Detail vermessen.

kann z. B. durch gleichzeitiges Einführen einer positiven und einer negativen Ladung in einen flexiblen Loopbereich die Rigidität der Struktur und damit die Thermostabilität erhöht werden. Dies führt unter Umständen zu einer Erhöhung der Thermostabilität des gesamten Proteins. Ein Nachteil der hohen Mutationsrate ist hingegen der hohe Anteil an inaktivierten Proteinen innerhalb der Bibliothek. Mittels der hier beschriebenen Durchflusszytometrie-Methode können diese Enzympopulationen innerhalb kürzester Zeit in aktive und inaktive Enzyme sortiert werden.

Abbildung 1 zeigt die Herstellung der Reaktionskompartimente. Die vesikulären Kompartimente enthalten neben den aus den

Metagenom- bzw. Zufallsmutagenese-Bibliotheken hervorgegangenen Klonen alle notwendigen Komponenten für einen enzymatischen Aktivitätsnachweis. Die Reaktionskompartimente mit einem Durchmesser von drei bis 100 Mikrometern sind unter Verwendung etablierter FACS-Technologien sowohl detektier- wie auch sortierbar. Die Durchflussraten bewegen sich hierbei zwischen 1.000 bis mehreren 10.000 Reaktionskompartimenten pro Sekunde. Dies führt zu einer effizienten Anreicherung und Isolierung aktiver Enzymvarianten oder neuartiger Enzyme. Darüber hinaus gewährleisten fluoreszenzbasierte Detektionssysteme aufgrund der lokalen Konzentration des Fluoro-

phors innerhalb der Reaktionskompartimente eine ausreichend hohe Sensitivität. Bei der Auswahl des Aktivitätsnachweises ist einzig darauf zu achten, dass das gewählte Fluorophor aufgrund seiner Ladungseigenschaften im Reaktionskompartiment verbleibt.

Monoxygenasen katalysieren chemisch anspruchsvolle Reaktionen wie beispielsweise die Hydroxylierung nicht-aktivierter Kohlenwasserstoffbindungen unter Verwendung von Sauerstoff als Oxidationsmittel. Im Gegensatz zu chemischen Reaktionen ist dies schon bei Raumtemperatur selektiv und mit Wechselzahlen von bis zu mehreren 1.000 pro Sekunde möglich. In Metagenomen sind Monoxygenasen häufig mit Hitraten von weniger als 10^{-6} aufzufinden. Um das Potenzial der Doppemulsionstechnologie mit durchflusszytometriebasierter Durchmusterung exemplarisch aufzuzeigen, sind im Folgenden die Ergebnisse eines Mutageneseexperimentes der P450 BM-3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* gezeigt [2], einer für die kommerzielle Anwendung interessanten Monoxygenase.

Als Ausgangsvariante wurde eine BM3-Doppelmutante (F87A/R471C) verwendet, die das in **Abbildung 2** dargestellte Cumarin-Modellsubstrat umsetzt. Mittels *error-prone*-PCR wurde eine Bibliothek mit ca. 5×10^5 Varianten generiert und in Doppemulsionen eingeschlossen. Bedingt durch die hohe Mutationsrate waren in der Variantenbibliothek nur noch knapp zwei Prozent der Klone aktiv. Nach dreimaliger Sortierung mittels der hier beschriebenen Durchflusszytometrie wurde eine Anreicherung um den Faktor 20 auf über 40 Prozent aktive Klone erreicht. Die angereicherten Kandidaten konnten des Weiteren im Mikrotiterplatten-Format bezüglich ihrer Aktivität vorcharakterisiert werden. Die hierbei detektierten drei besten Kandidaten wurden gereinigt und kinetisch untersucht (**Tab. 1**).

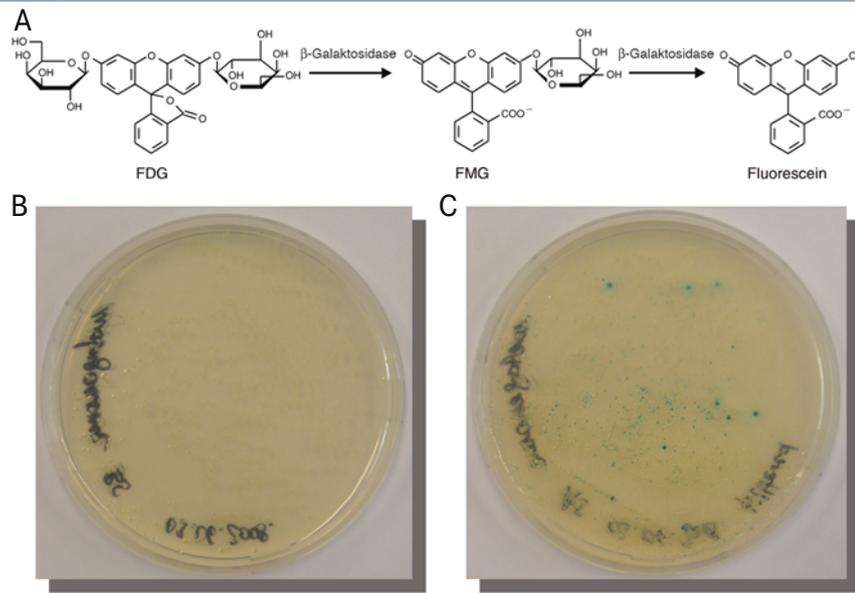
Alle drei Varianten enthielten zwischen vier und sechs Aminosäureaustausche. Durch eine einzige *in vitro*-Evolutionsrunde konnte trotz der relativ geringen Anzahl an durchmusternden Varianten eine bis zu 14-fache Aktivitätsverbesserung erzielt werden [3]. Diese Ergebnisse sind ein klarer Hinweis darauf, dass hohe Mutagenesefrequenzen zu eindeutig höheren Verbesserungen pro gelenkter Evolutionsrunde führen können. Gleichzeitig wird der Umfang der zu durchmusternden Bibliotheken in Mikrotiterplatten durch die Vorsortierung mittels Durchflusszytometrie signifikant verringert.

Tab. 1: Genetisch und kinetisch charakterisierte Varianten von P450 BM-3 (M1–M3) nach einer *in vitro*-Evolutionsrunde. M0: Ausgangsvariante mit zwei Substitutionen (F87A, R471C) im Vergleich zum Wildtyp; M1–M3: verbesserte Mutagenesevarianten mit zusätzlichen Aminosäureaustauschen.

Variante	Mutationen	K_m (μM)	k_{cat} (eq min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{eq min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	M/M0
M0	F87A, R471C	42,46	0,187	0,004	1
M1	L29S, R47Y, F87A, Q189R, R471C, Y857N	40,64	1,142	0,028	7,0
M2	E13G, R47L, F87A, R471C, L1030S	22,32	0,935	0,042	10,5
M3	E64G, F87A, R223H, M354S, R471C, T883H, P884R, N952D	47,94	2,621	0,055	13,8

Hier steht eine Anzeige.





▲ **Abb. 3:** Durchmusterung von *Escherichia coli*-Metagenomklonen in Doppelmulsionen unter Verwendung von Fluorescein-Digalaktosid als fluorogenem Substrat. **A**, Umsetzung des Substrats Fluorescein-Digalaktosid (FDG) über Fluorescein-Monogalaktosid (FMG) zu Fluorescein mittels β -Galaktosidase. **B, C**, Kultivierung einer Doppelmulsion auf X-Gal-Detektionsagar vor (B) und nach (C) Sortierung mittels Durchflusszytometrie. Weitere Erklärungen im Text.

Neben dem Einsatz in Mutagenesebibliotheken wurde die mikrokompartimentbasierte Durchflusszytometrie des Weiteren zum Durchmustern von Metagenombibliotheken eingesetzt. Ziel hierbei war die Anreicherung von rekombinanten Klonen mit Laktose-spaltender Aktivität. Hierzu wurden die Zellen ausgewählter Metagenombibliotheken wie oben beschrieben in Doppelmulsionen eingeschlossen und mittels Durchflusszytometrie durchmustert. Als Substrat diente hierbei Fluorescein-Digalaktosid. Nach dreimaliger Sortierung wurden die angereicherten Zellen auf X-Gal-Agar vereinzelt. **Abbildung 3** zeigt die kultivierten Zellen nach Sortierung mittels Durchflusszytometrie. Nahezu alle Klone zeigten nach Ausstrich auf X-Gal-Agar die charakteristische Blaufärbung. Hierdurch wird das Potenzial der fluoreszenzbasierten Doppelmulsionszytometrie auch für die Durchmusterung von komplexen Metagenombibliotheken eindrucksvoll unter Beweis gestellt.

Zusammenfassung

Es lässt sich festhalten, dass die hier beschriebene durchflusszytometrische Durchmusterungstechnologie unter Verwendung von Doppelmulsionen neue Möglichkeiten im Bereich der gelenkten Evolution mit hohen Mutagenesefrequenzen bietet. Besonders wertvoll sind diese zytometrischen Methoden zur Vorsortierung und Anreicherung aktiver Populationen, die anschließend in Systemen mit geringerer Durchsatzrate quantitativ untersucht werden können. Darüber hinaus

bietet die Technologie neue Möglichkeiten zur Erschließung von komplexen mikrobiellen Sequenzräumen, dem „Metagenom“. Hierbei ist es nun möglich, enzymatische Aktivitäten zu detektieren, die bisher aufgrund geringer Hitraten mit klassischen Nachweismethoden nur begrenzt zugänglich waren. Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die hier beschriebene Methodik auch einige Limitierungen aufweist. So ist man in der Auswahl der Substrate immer auf eine Assoziation mit einem Fluorophor angewiesen, und es ist erforderlich, dass das Substrat aufgrund seiner Ladungseigenschaften innerhalb der Emulsionspartikel verbleibt. Neben den genannten Monoxygenasen und Laktasen wurden kürzlich für Proteasen [4] und Glukoseoxidasen [5] durchflusszytometrieba-

sierte Protokolle beschrieben. Neben der Durchflusszytometrie bieten nur mikrofluidische Systeme ein vergleichbares Potenzial für die aktivitätsbasierte Durchmusterung von Genbibliotheken, und man darf aufgrund der ökonomischen Bedeutung der gelenkten Evolution und der Metagenomik gespannt sein, welche Technologiesprünge uns in den kommenden Jahren erwarten.

Danksagung

Die Autoren danken dem BMBF für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des „Bio-ChancePLUS“-Programms. ■

Literatur

- [1] Griffith AD, Tawfik DS (2007) Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends Biotechnol* 24:395–402
- [2] Tee KL, Schwaneberg U (2007) Directed evolution of oxygenases: screening systems, success stories and challenges. *Comb Chem High Throughput Screen* 10:197–217
- [3] Ruff AJ, Dennig A, Wirtz G et al. (2012) Flow cytometer-based high throughput screening system for accelerated directed evolution of P450 monooxygenases. *ACS Catal* 2:2724–2728
- [4] Martinez R, Prodanovic R, Klein M et al. (2011) A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases. *J Biomol Screen* 16:285–294
- [5] Prodanovic R, Ostafe R, Scacioc A et al. (2011) Ultrahigh throughput screening system for directed glucose oxidase evolution in yeast cells. *Comb Chem High Throughput Screen* 14:55–60

Korrespondenzadresse:

Dr. Frank Niehaus
B.R.A.I.N. AG
Darmstädterstraße 34–36
D-64673 Zwingenberg
Tel.: 06251-9331-27
Fax: 06251-9331-11
fn@brain-biotech.de
www.brain-biotech.de

AUTOREN



Frank Niehaus
Jahrgang 1963. Biologiestudium an der Universität Münster. 1996 Promotion, 1996–1999 Postdoc an der TU Hamburg-Harburg. Seit 1999 Wissenschaftler bei der B.R.A.I.N. AG, Zwingenberg.



Milan Blanus
Jahrgang 1980. Studium der Biotechnologie an der Jacobs Universität, Bremen. 2009 Promotion, 2010–2011 Postdoc an der Jacobs Universität, seit 2011 Senior Wissenschaftler und Unit Manager bei der 4-Antibody AG, Jena.



Ulrich Schwaneberg
Jahrgang 1969. Chemiestudium an der Universität Stuttgart. 1999 Promotion, 2000–2001 Postdoc am California Institute of Technology, Pasadena, USA. 2002–2008 Professor und Arbeitsgruppenleiter an der Jacobs Universität, Bremen, seit 2009 Leiter des Instituts für Biochemie an der RWTH Aachen, wissenschaftlicher Leiter des Deutschen Wollinstituts und Executive Managing Director am Bioeconomy Science Center.