

Berichte aus dem
Institut für Systemdynamik
Universität Stuttgart

Band 18

Ronny Feuer

**Modellbasierte Methoden zur Analyse
der adaptiven Evolution von Mikroorganismen
unter Laborbedingungen**

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag
Aachen 2013

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2013

Copyright Shaker Verlag 2013

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2235-3

ISSN 1863-9046

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Kurzfassung

Diese Arbeit beschreibt Methoden, die zur Analyse von Stoffwechselnetzwerken und zur modellgestützten Auswertung von Messdaten eingesetzt werden können. Es werden Experimente zur adaptiven Evolution unter Laborbedingungen mit *Escherichia coli* durchgeführt und die Auswertung eines evolvierten Stammes mit modellbasierten Methoden unterstützt. Zudem wird eine Prozessführung für die Umsetzung des Evolutionsexperimentes im kontinuierlich betriebenen Bioreaktor etabliert.

Hintergrund. Während der adaptiven Evolution von Mikroorganismen unter gleichbleibenden Umweltbedingungen lässt sich der Trend beobachten, dass die Population ihre Biomasseausbeute verbessert und die maximale Wachstumsrate erhöht. Mit der Flussbilanzanalyse lassen sich Vorhersagen über die optimale Biomasseausbeute und die maximale Wachstumsrate treffen. In der Arbeit wurden in einem *E. coli* Stamm die Hauptstoffwechselwege zur Produktion des wichtigen Metaboliten Pyruvat durch genetische Modifikation blockiert. Der Stamm war daraufhin abhängig von einer Pyruvatquelle. Im Verlauf der adaptiven Evolution wurden alternative endogene Pyruvatsynthesewege nutzbar. Dadurch hat die Population die Pyruvatauxotrophie überwunden.

Mit Hilfe von Stoffwechselmodellen sollen Vorhersagen über die alternativen Pyruvatsynthesewege getroffen werden. Die Aufklärung der Mechanismen während der adaptiven Evolution ist eine große Herausforderung und soll durch den Einsatz von Modellen erleichtert werden.

Auf bestimmten alternativen Stoffwechselwegen, die auch aus Fremdorganismen eingebracht werden können, fallen Nebenprodukte an, die ausgeschieden werden. Ersetzt ein solcher alternativer Stoffwechselweg den ursprünglichen Pyruvatsyntheseweg, dann ist die Ausscheidung des Nebenproduktes nach der adaptiven Evolution an die Wachstumsrate gekoppelt. Damit kann der evolvierte Stamm als Produktionsstamm für das Nebenprodukt eingesetzt werden.

Analyse von Stoffwechselnetzwerken. Mit Hilfe der konvexen Optimierung kann der Lösungsraum von Stoffwechselmodellen analysiert werden. Es wurde eine Methode entwickelt, welche die oberen und unteren Schranken des thermodynamisch zulässigen Flusspektrums bei einer gegebenen Nebenbedingungsmenge berechnet. Diese thermodynamisch konsistente Flussvariabilitätsanalyse (tkFVA) berücksichtigt das zweite Kirchhoffsche Gesetz und schließt dadurch thermodynamisch unmögliche Kreisflüsse aus. Die tkFVA integriert die Energiebilanzanalyse in der Flussvariabilitätsanalyse (FVA). Sie benötigt keine zusätzlichen Informationen über die chemischen Standardpotentiale von Metaboliten und kann daher die FVA in ihren Anwendungsfeldern ersetzen. Das Flusspektrum der tkFVA ist gegenüber der FVA deutlich eingeschränkt.

Das Flusspektrum enthält die Information über alternative Stoffwechselwege. Für einige Metabolite ist die Extraktion der alternativen Produktionswege aus dem Flusspektrum aufgrund der Komplexität erschwert. Die Rückverfolgung des C-Körpers eines Metaboliten zum Substrat auf Basis eines Algorithmus liefert die Gruppen von alternativen Produktionswegen. Diese Gruppen sind Vorhersagen alternativer Produktionswege, die sich während der adaptiven Evolution einstellen können. Für eine evolvierte Mutante mit blockierten Hauptpyruvatsynthesereaktio-

nen konnte die Nutzung mehrerer alternativer Pyruvatproduktionswege nachgewiesen werden. Für einige Metabolite lassen sich alternative Produktionswege an die Wachstumsrate koppeln. Diese Metabolite werden durch die Berechnung der minimalen Umsatzraten von Metaboliten identifiziert.

Modellgestützte Auswertung von Daten. Zur Auswertung von Fermentationsdaten auf Basis eines Stoffwechselmodells wird die Methode der metabolischen Fluss schätzung (MFE) erweitert. Bei der MFE werden aus zeitlich verteilten Messungen der nicht bilanzierten Stoffe und der Biomasse die Schranken der thermodynamisch zulässigen Flussspektren von mittleren Reaktionsraten für Zeitintervalle geschätzt. Zudem werden Konfidenzintervalle für die geschätzten Raten berechnet. Ebenso werden Methoden zur Auswertung von Microarraydaten auf Basis von Stoffwechselmodellen diskutiert.

Mechanismen während der adaptiven Evolution. Bei der Freischaltung alternativer Produktionswege während des Evolutionsexperimentes wurde ein Einfluss auf der Ebene der transkriptionellen Regulation vermutet. Deshalb wurde das Stoffwechselnetzwerk mit einem Booleschen Transkriptionsfaktornetzwerk erweitert. Im Falle einer evolvierten Mutante, in der alternative Pyruvatproduktionswege ablaufen, konnte kein direkter Einfluss von Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung der alternativen Wege nachgewiesen werden. Vielmehr spielten Zerfallsprozesse aufgrund von reaktiven Sauerstoffspezies und der Abbau von toxischen Zerfallsprodukten eine Rolle bei der Entwicklung der Pyruvatprototrophie des Stammes. Diese Prozesse beeinflussten daraufhin die transkriptionelle Regulation.

Um den Einfluss von Transkriptionsfaktoren während der adaptiven Evolution direkt beobachten zu können, wurden Regulatoren vorhergesagt, deren Deletion unter bestimmten Umweltbedingungen eine Verminderung der Biomasseausbeute bewirken. Die Vorhersagen wurden experimentell bestätigt. Die Regulationsmutanten konnten im Prozess der adaptiven Evolution diese Verminderung der Biomasseausbeute abbauen.

Prozessführung für das Evolutionsexperiment. Das Evolutionsexperiment wird in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor mit variabler Verdünnungsrate durchgeführt. Die stationären Zustände der Biomassekonzentration im Reaktor lassen sich mit der Chemostatgleichung, die um den Erhaltungsstoffwechsel erweitert wird, beschreiben. Der Selektionsdruck wird durch die Ableitung der stationären Substratkonzentration nach den Populationsparametern charakterisiert und lässt sich über die Verdünnungsrate einstellen. Am Betriebspunkt der maximalen Produktivität der Biomasse reichern sich die Mutationen in der Population an. Im Turbidostat bei einer Verdünnungsrate nahe der maximalen Wachstumsrate werden Subpopulationen mit verbesserten Populationsparametern bei der Durchsetzung im Reaktor unterstützt. Die Turbidostatregelung wird mit einem adaptiven LQ-Regler auf Basis des Chemostatmodells realisiert und mit einem Permittivitätssignal einer Radio-Frequenz-Impedanz Messung, das mit der Biomassekonzentration korreliert, gestützt. In den Versuchen mit dieser Prozessführung wurde während der adaptiven Evolution eine Zunahme der Biomasseausbeute und eine erhebliche Steigerung der maximalen Wachstumsrate beobachtet.