Modellbasierte Methoden zur Analyse der adaptiven Evolution von Mikroorganismen unter Laborbedingungen

Der Fakultät Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
vorgelegte Abhandlung

von

Ronny Feuer
aus Leipzig

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Oliver Sawodny
Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. sc. nat. Stefan Schuster
Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2013

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

Vorwort

Die adaptive Evolution von eigenen Vorstellungen über die adaptive Evolution von Mikroorganismen beschreibt meine persönliche Lernhistorie in diesem Promotionsprojekt. Dieser Evolutionsprozess der eigenen Vorstellungen hat meine Idee von Wissenschaft und Forschung nachhaltig geprägt. Ich hatte die Gelegenheit, mit meinen naiven Vorstellungen an die biologischen Wirklichkeit heranzutreten und zu scheitern, um anschließend eine Idee von der Komplexität der Zusammenhänge zu bekommen und endgültig die Faszination für die Anpassungsfähigkeit des Lebens zu entdecken.

Für diese Gelegenheit braucht es gewisse Rahmenbedingungen. Dr.-Ing. Michael Ederer als mein PostDoc hat mir mit seiner geduldigen Art überhaupt den Freiraum für die Entdeckungen gelassen und mich gleichzeitig am Boden der Tatsachen festgebunden. Prof. Oliver Sawodny hat mir in jeder Hinsicht den Rücken freigehalten und meine Arbeit gefördert. Prof. Georg Sprenger hat dieses spannende Projekt zusammen mit Prof. Thomas Sauter ins Leben gerufen. Marion Fleischer hat mir nicht nur mehrere Tonnen Medium für die Chemostatversuche angerührt und unzählige Proben analysiert, sondern mir auch den praktischen Laboralltag näher gebracht. Dr. rer. nat. Katrin Gottlieb hat einen Großteil der mikrobiologischen Experimente durchgeführt, die leider oft zur Ablehnung meiner Hypothesen geführt haben, und hat gleichzeitig neue Hypothesen mit inspiriert. Meine Kollegen im Institut für Systemdynamik haben mir, ursprünglich ein Naturwissenschaftler, Einblicke in die Ingenieurwissenschaften gewährt. Sie, besonders Florian Malchow, haben mich auch in der Realisierung regelungstechnischer Fragestellungen tapfer unterstützt und mir mit Rat und Tat bei Seite gestanden. Ebenfalls möchte ich Prof. Stefan Schuster für die Übernahme des Mitberichtes danken.

Den Institutionen Deutsche Forschungsgemeinschaft, Landesstiftung Baden-Württemberg und Bundesministerium für Bildung und Forschung möchte ich für die Finanzierung meiner Projekt danken.

Um Faszination zu entdecken und zu erhalten, sowie das Leben neugierig in Angriff zu nehmen, braucht der Mensch auch Zerstreuung. Meine liebste Frau Anne versüßte mir das Leben, so dass mir die ungeliebte Schreibarbeit nur halb so schwer viel. Die Erlebnisse mit dem TangoPOP-Team um Enrique und Judita waren mir in vielen Stunden der wichtige Ausgleich, der mir Kraftquell zur Inspiration war.

Stuttgart, im Dezember 2012

Ronny Feuer

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 Flusspektren 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-Impedanzmessung, 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.

Abstract

This work describes methods for the analysis of metabolic networks and the model-based evaluation of measurements. An adaptive evolution experiment under controlled conditions with *Escherichia coli* is performed and the analysis of an evolved strain is supported by model-based methods. Moreover, a platform for the realisation of evolutionary experiments in continuously operating bioreactors is presented.

Background. During adaptive evolution of microorganisms under controlled environmental conditions there is a tendency to improve a populations biomass yield and maximal growth rate. Flux balance analysis can predict optimal biomass yields and maximal growth rates.

In this work, main metabolic pathways to pyruvate were blocked by applying genetic modifications in *E. coli*. Therefore, the strain was dependent on an external pyruvate source. During adaptive evolution alternative endogenous pyruvate synthesizing pathways were utilised. Thus, the population has overcome pyruvate auxotrophy.

It is shown that the alternative pyruvate synthesizing pathways can be predicted by means of a metabolic network. Despite of genome-scale measurements like genomics and transcriptomics, it is a challenge to clarify the mechanisms which play a role during adaptive evolution. Thus, model-based methods are used to identify these mechanisms.

Some alternative pathways which also could originate from other organisms produce by-products that have to be secreted. If such a pathway replaces the original pyruvate synthesizing pathway during adaptive evolution the by-product secretion is coupled to the growth of the organisms. Hence, the evolved strain can be used as a production strain for the by-product.

Analysis of metabolic networks. Convex optimisation techniques can be used to analyse the solution space of metabolic networks. In this work, a method was developed which computes the upper and lower bounds of the thermodynamically feasible flux spectrum of a given set of constraints. This method is called thermodynamically consistent flux variability analysis (tcFVA). The tcFVA takes Kirchhoff's second law into account to restrict thermodynamically infeasible reaction cycles. It integrates energy balance analysis into flux variability analysis (FVA). The tcFVA does not need additional information about chemical standard potentials. Thus, it can replace FVA in its applications completely. The flux spectrum of the tcFVA is significantly smaller than flux spectrum of the FVA.

The flux spectrum contains alternative metabolic pathways to produce metabolites. For some metabolites, the complexity of the flux spectrum prevents the extraction of these pathways. The tracing of carbon cores of metabolites back to the substrate is the basis of a newly developed algorithm to compute groups of alternative synthesis pathways. These groups are the predictions of alternative synthesis pathways that can occur during adaptive evolution. The use of some of the predicted pyruvate synthesis pathways was verified in an evolved mutant with blocked main pyruvate synthesis.

For some metabolites it is possible to couple the alternative synthesis pathways to the growth of the organisms. They can be identified by computing the minimal turnover rates of metabolites.

Model-based evaluation of measurements. To evaluate measurements from fermentations based on a metabolic network the method of metabolic flux estimation (MFE) is enhanced. The MFE uses temporal distributed measurements of unbalanced metabolites and biomass. It estimates the bounds of thermodynamically feasible flux spectra that are averaged over certain time intervals. It benefits from the use of the tcFVA method. Moreover, confidence intervals are computed for the estimated rates.

Furthermore, methods to evaluate microarray data based on metabolic networks were described and discussed.

Mechanisms during adaptive evolution. It was assumed that transcriptional regulation is involved in the activation of alternative synthesis pathways during adaptive evolution. Thus, a metabolic network was extended by a Boolean transcription factor network. Pathway repression was predicted by the combined model. In the case of an evolved mutant which uses alternative pyruvate synthesis pathways, a direct influence of transcriptional regulators on pathway activation could not be detected. Instead, processes of degradation due to reactive oxygen species and the removal of toxic degradation products played a major role in the development of pyruvate prototrophy of the strain. Finally, these processes influenced the transcriptional regulation.

To observe a direct influence of transcriptional regulators during adaptive evolution regulators were predicted whose deletion will reduce the biomass yield under certain environmental conditions. The predictions were experimentally verified. The regulatory mutants could compensate for the decreased biomass yield during the adaptive evolution.

Process control for evolution experiment. The evolution experiment was performed in a continuously operating bioreactor with variable dilution rate. The steady states of the biomass concentration in the reactor was described by the chemostat equation which was extended by a parameter for biomass maintenance. The selective pressure was characterised by the derivative of the steady state substrate concentration with respect to the parameters of the population. The selective pressure can be adjusted by the dilution rate. The operating point of maximal biomass productivity was chosen to accumulate mutations in the population. If the bioreactor is operated in a turbidostat mode with a dilution rate close to the maximal growth rate, subpopulations with improved population parameters are supported to prevail against others. An adaptive linear quadratic regulator based on the chemostat model was used for turbidostat control. The permittivity correlates with the biomass concentration in the bioreactor. A radio-frequency impedance device measured the permittivity. The signal of the device was autocorrelated. Thus, the signal was processed by means of a Kalman-filter. The filtered signal was used as a measurement for the turbidostat control.

An increase of biomass yield and a considerable enhancement of maximal growth rate was observed using this setup of process control. This was shown with different strains under various environmental conditions.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	13
2. Methoden für Constraint-basierte Modelle (CBM)	21
2.1. Stöchiometrische Netzwerke	22
2.2. Voraussetzungen der Flussbilanzanalyse	23
2.2.1. Fließgleichgewicht (FGG)	23
2.2.2. Thermodynamische Beschränkungen	24
2.2.3. Biomassezusammensetzung und Erhaltungsstoffwechsel	26
2.3. Klassische Flussbilanzanalyse	28
2.3.1. Berechnung der maximalen Wachstumsrate und optimalen Ausbeute	29
2.3.2. Analyse der Lösungsmengen von Stoffwechselmodellen	30
2.3.3. Flussvariabilitätsanalyse	30
2.4. Thermodynamische Zulässigkeit in Reaktionsnetzwerken	31
2.4.1. Energiebilanzanalyse	31
2.4.2. Thermodynamisch konsistente Flussvariabilitätsanalyse	33
2.4.3. Algorithmus für tkFVA	37
2.4.4. tkFVA an zwei Beispielnetzwerken	38
2.4.5. tkFVA am Beispiel von iAF1260	41
2.4.6. Zusammenfassung tkFVA	42
2.5. Metabolische Flusssschätzung (MFE)	45
2.5.1. MFE Methode	45
2.5.2. Fehlerabschätzung in der MFE	49
2.5.3. MFE an einem Beispielnetzwerk	53
2.5.4. Zusammenfassung zur MFE	55
2.6. Methoden zur Unterstützung des Evolutionsexperimentes	58
2.6.1. Umsatzraten von Metaboliten	58
2.6.2. Alternative Reaktionen zur Umgehung metabolischer Blockaden	63
2.6.3. Alternative Stoffwechselwege zu Metaboliten	65
2.6.4. Visualisierung von Flussverteilungen	67
3. Anwendung der CBM-Methoden in einem Evolutionsexperiment mit E. coli	71
3.1. Beschreibung des Experimentes mit F41 <i>mal::pyc</i>	72
3.2. Alternative Wege zum Pyruvat	73
3.3. Erweiterung von CBMs mit Transkriptionsfaktornetzwerkmodellen	77
3.3.1. Integration des Booleschen Transkriptionsfaktornetzwerkes iMC1010v2	79
3.3.2. Anpassung von iMC1010v2 auf iAF1260	80
3.3.3. Analyse der Aussagekraft des TFN	81
3.3.4. Auswirkung des TFN auf die vorhergesagten alternativen Stoffwechselwege für F41 <i>mal::pyc</i>	83
3.4. Experimentelle Auswertung	84

3.4.1.	Ergebnisse der Genomresequenzierung von K98-62	84
3.4.2.	Genexpressionsdaten zum Stammvergleich	86
3.4.3.	Wachstumsphänotyp von F41 <i>mal::pyc</i>	92
3.4.4.	Hypothesen zum Wachstumsphänotyp von K98-62	92
3.5.	Diskussion des Evolutionsexperimentes mit F41 <i>mal::pyc</i>	94
3.6.	Adaptive Evolution nach Modifikationen der transkriptionellen Regulation	95
3.6.1.	Prädiktion von Regulatoren mit Einfluss auf die Ausbeute ohne Transkriptionsfaktornetzwerk	95
3.6.2.	Ergebnisse für die Mutante LJ110 Δ <i>gadE-cat</i>	97
4.	Prozessführung im Evolutionsexperiment	99
4.1.	Modellierung eines kontinuierlich betriebenen Bioreaktors	100
4.1.1.	Klassische Chemostatgleichung	101
4.1.2.	Chemostatgleichung mit Erhaltungsstoffwechsel	103
4.2.	Systemanalyse	103
4.2.1.	Stationarität und Stabilität	103
4.2.2.	Zeitkonstanten und stationäre Verstärkung des Systems	106
4.2.3.	Sensitivität der Biomasse gegenüber den Parametern	107
4.2.4.	Konkurrierende Populationen	108
4.2.5.	Der evolutive Druck	109
4.2.6.	Maximale Anzahl von Mutationsereignissen	110
4.2.7.	Bestimmung der Modellparameter	113
4.2.8.	Übereinstimmung des Modells mit experimentellen Beobachtungen	115
4.2.9.	Zusammenfassung Systemanalyse	117
4.3.	Prozessführung	117
4.3.1.	Radio-Frequenz-Impedanz Messung	118
4.3.2.	Störgrößenbeobachter zur Erkennung von Stationarität und von kritischen Reaktorzuständen	123
4.3.3.	Permittivitätssignal umgerechnet in Biomassekonzentration	126
4.3.4.	Stabilisierung der Biomassekonzentration durch einen adaptiven LQ-Regler	128
4.3.5.	Beobachter und adaptiver LQ-Regler im Experiment	137
4.3.6.	Ablaufsteuerung und Auswertung für ein Evolutionsexperiment	140
4.3.7.	Zusammenfassung zur Prozessführung	144
5.	Diskussion und Zusammenfassung	147
A.	Anhang	153
A.1.	Flussbilanzanalyse mit iAF1260	153
A.2.	Experimentelle Bedingungen, Daten und Stämme des Experimentes mit <i>E. coli</i>	153
A.3.	MFE Anwendung bei <i>R. rubrum</i>	158
A.3.1.	Aufbereitung der Fermentationsdaten für die MFE	158
A.3.2.	Anwendung der MFE	165
A.3.3.	Auswertung der Ergebnisse M215	172
A.4.	Grundlagen für die Prozessführung	173
A.4.1.	Lösung linearer Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten	173
A.4.2.	Beobachtbarkeit und Steuerbarkeit	173

Tabellenverzeichnis	179
Abkürzungsverzeichnis	180
Symbolverzeichnis	181
Literatur	183