

Evolutionstechnologie

Experimentelle Evolution *in vivo* in kontinuierlicher Suspensionskultur

RUPERT MUTZEL¹, PHILIPPE MARLIÈRE²

¹INSTITUT FÜR BIOLOGIE, FU BERLIN

²HEURISKO USA INC., DELAWARE, USA

Die Selektion von adhäsiven, adaptiv statischen Zellen stellt das Hauptproblem bei Langzeitexperimenten zur experimentellen Evolution von Organismen in kontinuierlicher Suspensionskultur dar. Ein automatisiertes System von zwei Kulturgefäßen, die abwechselnd chemisch sterilisiert werden, löst dieses Problem.

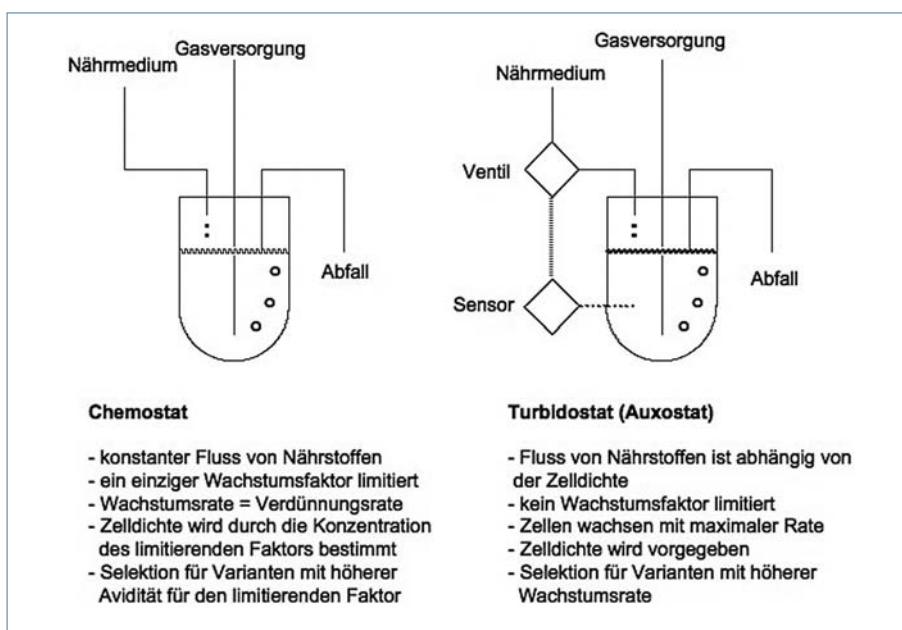
A strategy for experimental evolution by automated permanent proliferation of cells exclusively in suspension is described.

■ Vor 60 Jahren beschrieben Monod [1] sowie Novick und Szilard [2] unabhängig die Technik der kontinuierlichen Kultur lebender Organismen in Suspension. Im Chemostat (Abb. 1) wird ein Kulturgefäß konstanten Volumens mit konstanter Rate mit frischem Nährmedium beschickt und mit gleicher Rate Organismensuspension entfernt. Damit die Population nicht ausgewaschen

wird, muss sie mit einer Rate wachsen, die wenigstens der Verdünnungsrate entspricht. Nach einer physiologischen Adaptationsphase stellt sich ein Gleichgewicht ein – bestimmt durch die Verfügbarkeit eines limitierenden Wachstumsfaktors oder die Akkumulation eines wachstumshemmenden Faktors. Auxostaten koppeln die Verdünnungsrate an einen Parameter der Zellsuspension, z. B. die Zell-

dichte (Turbidostat, Abb. 1, [3]) – hier ist die Verdünnungsrate unter experimentell vorgeählten optimalen Wachstumsbedingungen abhängig von der Wachstumsrate der Organismen.

Solche Kulturapparaturen sind ein hervorragendes Werkzeug, um Populationen von Organismen unter strikt kontrollierten physikalischen, chemischen und biologischen Umweltbedingungen experimentell zu evolvieren: Erscheint im Chemostat eine genetische Variante, die den limitierenden Wachstumsfaktor effizienter akkumulieren oder verwerten kann, so wird sie „pro Mol“ dieses Faktors mehr Nachkommen produzieren und sich in der Population durchsetzen; im Turbidostat erzeugt eine Variante mit höherer Wachstumsrate pro Zeiteinheit mehr Nachkommen als ihre genetischen Vorläufer und wird diese aus der Population verdrängen. Die populationsdynamische Analyse genetischer Adaptationsprozesse ist einfach, da die Wachstumsrate der Population gleich der Verdünnungsrate ist: Im Chemostat führt die Selektion einer Variante mit höherer Bindungsstärke an den limitierenden Wachstumsfaktor zu einer Erhöhung der Biomasseproduktion, im Turbidostat führt die Selektion einer Variante mit höherer Wachstumsrate zur Erhöhung der Verdünnungsrate, sodass aus Veränderungen von Ausbeuten und Verdünnungsraten direkt Veränderungen in der Fitness genetischer Varianten ausgelesen werden können [4].

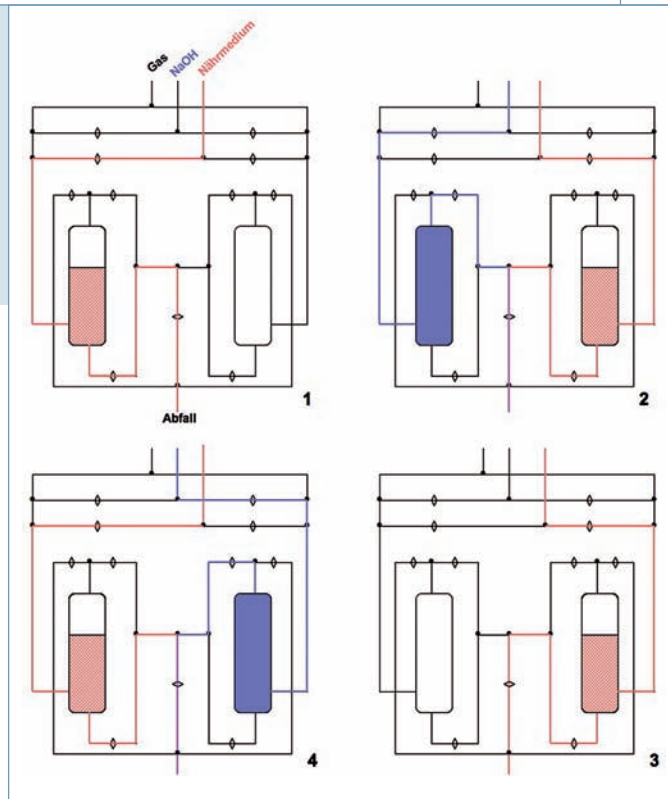


Kuckuckseier im Kulturgefäß – Selektion von Biofilmen

Wenn diese „Evolutionstechnologie“ bereits vor Jahrzehnten auf einem soliden theoretischen Fundament ruhte, warum wartete man seither vergebens auf ihre Anwendung? Wie immer in der Evolution geht es darum, am Ende „noch da zu sein“. Die Organismen heute auf diesem Planeten sind die, die noch da sind. Bei „Evolution in kontinuierlicher Kultur“ ist der Organismus am Ende des Experiments „noch da“, wenn er nicht durch die kontinuierliche Verdünnung ausgewaschen wur-

▲ Abb. 1: Aufbau und Funktion von Chemostat und Turbidostat, Apparaturen zur kontinuierlichen Kultur von Zellen.

► **Abb. 2:** Aufbau und Funktionsweise des Genemats zur permanenten Proliferation von Zellen in Suspension [12]. Schritt 1: Kultur wächst im linken Kulturgefäß, rechtes Gefäß ist leer und steril. Schritt 2: Kultur wächst nach Transfer im rechten Gefäß, linkes Gefäß wird sterilisiert. Schritt 3: Kultur wächst im rechten Gefäß, linkes Gefäß ist leer und steril. Schritt 4: Kultur wächst nach Transfer im linken Gefäß, rechtes Gefäß wird sterilisiert. Linien: Leitungsabschnitte; Rauten: Absperrventile; rot: Nährmedium und Zellsuspension; blau: NaOH. Der Übersichtlichkeit halber ist das Leitungssystem für die neutralisierende Pufferlösung nicht dargestellt.



de. Diesem Zwang gehorchen Organismen am effizientesten durch die Bildung verdünnungsresistenter, adhäsiver Varianten, die innere Oberflächen der Kulturapparatur besiedeln. Lange bevor man Biofilme intensiv in der Mikrobiologie erforschte, waren sie als Hauptproblem bei der kontinuierlichen Kultivierung von Zellen in Suspension erkannt [5, 6], und die Vermeidung ihrer Bildung war Gegenstand teils origineller technischer Lösungsansätze (bis hin zu „Scheibenwischern“, um adhäsive Zellen mechanisch von den inneren Oberflächen der Kulturapparatur zu entfernen [7]). Keiner dieser Ansätze löste das Problem, sodass als frustrierende Erkenntnis blieb: Die kontinuierliche Kultivierung von lebenden Organismen in konventionellen Kulturapparaturen führt zur raschen Selektion adhäsiver, verdünnungsresistenter Varianten, die sich nicht mit frei schwimmenden Varianten messen müssen. Am deutlichsten kann das im Turbidostatregime demonstriert werden, wo der Bewuchs von Oberflächen zwischen Sender und Empfänger eines optischen Messsignals zu einer positiven Rückkopplung führt, sodass suspendierte Organismen effizient ausgewaschen und alle Ressourcen von den Biofilmbildenden „Kuckuckseiern“ verwendet werden.

Dieses Dilemma steht auch am Beginn von Richard Lenskis berühmtem Langzeit-Experiment, in dem *Escherichia coli*-Populationen seit 1988 über inzwischen mehr als 40.000 Generationen in serieller Kultur gezüchtet werden [8]. Diese Technik verhindert die Selektion adhäsiver Varianten, weil die Zellen regelmäßig in frische Kulturgefäße übertragen werden. Nachteile sind hoher Arbeitsaufwand und Kontaminationsgefahr beim Überimpfen, diskontinuierliches Wachstum der Population mit lag-, logarithmischen und stationären Phasen in jeder Kultivierungs-episode sowie die regelmäßige Passage durch einen engen Flaschenhals kleiner Individuenzahlen.

Der Genemat, ein „automatisierter Lenski“

Eine Apparatur, in der automatisiert große Populationen von Organismen über lange Zeit-

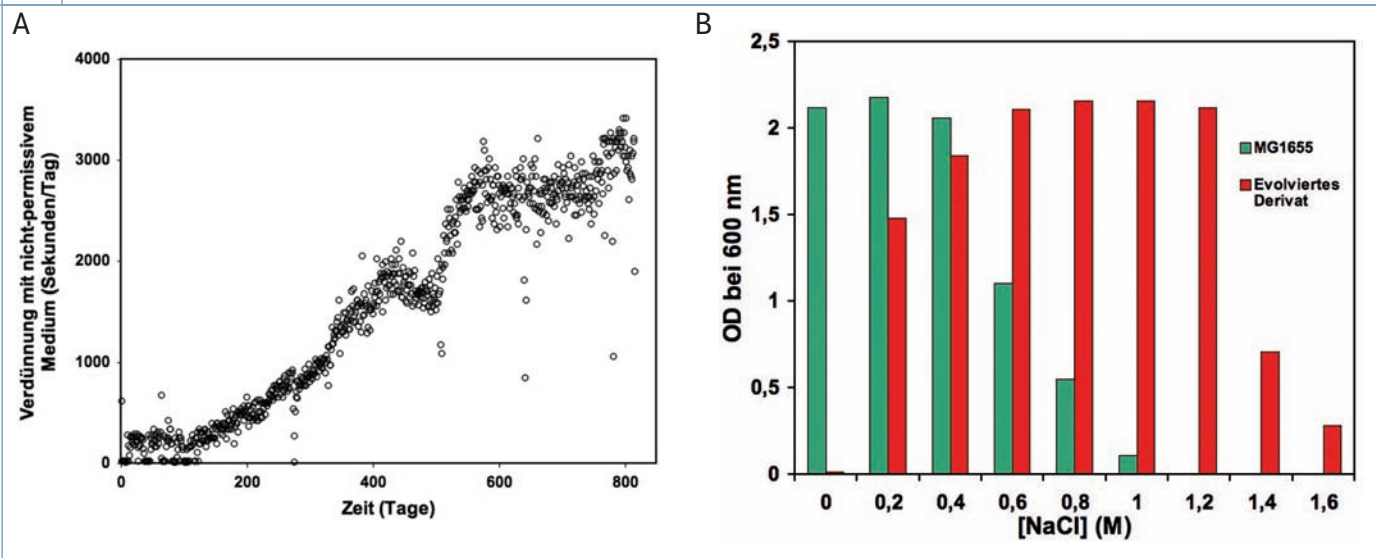
räume unter Selektion gezüchtet werden können, muss (1) eine Population von Zellen in Suspension unter permanenter Proliferation halten, (2) adhären, adaptiv statische Zellen in irgendeinem Teil der Apparatur regelmäßig zerstören, (3) die Population von Zellen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten und (4) beliebig lange autonom arbeiten.

Diese Anforderungen erfüllt die in **Abbildung 2** schematisch dargestellte Apparatur [9]. Das Grundproblem der kontinuierlichen Kultur, die Selektion von adhäsiven Varianten, wird dadurch gelöst, dass die Suspension von Organismen abwechselnd in einem von zwei Kulturgefäßen wächst, die wiederum abwechselnd durch ein letales Agens – z. B. konzentrierte NaOH – sterilisiert und anschließend mit einer Pufferlösung neutralisiert werden. Wer mögliche Leitungsschaltungen in **Abbildung 2** durchspielt, wird sehen, dass die Kulturgefäße „leer“, „voll“ oder bis zu einem durch die Lage des zentralen Siphons definierten Spiegel gefüllt sein können. In diesem Zustand wird während der kontinuierlichen Kultur das Volumen konstant gehalten. Während einer Sterilisierungsphase wird nach dem Transfer der Kultur in das zweite Kulturgefäß das erste Gefäß mit dem sterilisierenden Agens gefüllt und die nach oben abgehenden Leitungsabschnitte ebenfalls von diesem durchströmt. Jeder Teil der Apparatur, der mit lebenden Organismen in Kontakt war, kann so sterilisiert werden, bevor das sterilisierende Agens in den Abfallbehälter geleitet und das Kulturgefäß vollständig entleert wird. Flüsse von Zellsuspension und von Nährmedium, sterilisierenden und neutralisierenden Lösungen werden durch ein unter Druck stehendes Gas getrieben, das auch der Gasversorgung der wachsenden Kultur dient. Die Kulturgefäße kön-

nen durch Heiz- und Kühleinrichtungen thermostatisiert werden, Absperrventile werden durch einen programmierbaren Industrieautomaten angesteuert.

Abbildung 2 zeigt die einfachste Version unserer als Genemat bezeichneten Apparatur, die die permanente Proliferation von Zellen in Suspension in einem Chemostatregime erlaubt. In diesem Fall werden der Kultur durch periodisches Öffnen des Ventils, das den Fluss von Nährmedium kontrolliert, Pulse frischen Mediums zugeführt und ein identisches Volumen an Zellsuspension über den zentralen Siphon abgeleitet. Die Messung der optischen Dichte der Kultur erlaubt es, den Fluss von Nährmedium von der Zelldichte abhängig zu machen und ein Turbidostatregime anzuwenden. Weitere Modifikationen dieser Prototypen sind die Verwendung mehrerer Quellen unterschiedlicher Nährmedien, die beispielsweise wachstumshemmende Komponenten oder limitierende Konzentrationen an Wachstumsfaktoren enthalten können (siehe unten).

Bei Experimenten mit Bakterienpopulationen arbeiten wir mit Kulturvolumina von etwa 25 Milliliter (bei einer Zelldichte von 10^9 Zellen pro Milliliter besteht die unter Selektion kultivierte Population aus rund 2×10^{10} Zellen; die Wahrscheinlichkeit für die Mutation eines Basenpaares in *E. coli* ist $5,4 \times 10^{-10}$ [10]), für Versuche mit eukaryotischen Zellen wurden auch Kulturgefäße mit 250 Milliliter Volumen eingesetzt. Dass wir Experimente störungsfrei über Laufzeiten von mehr



▲ **Abb. 3:** Experimentelle Evolution eines halotoleranten Derivats von *Escherichia coli* MG1655. **A,** Entwicklung der NaCl-Konzentration in der Kultur über die Zeit. Die Kultur wird mit permissivem Medium (Minimalmedium mit 0,8 M NaCl) verdünnt, wenn die OD_{600 nm} unter 0,8 liegt, mit nicht-permissivem Medium (Minimalmedium mit 2 M NaCl), wenn die OD_{600 nm} über 0,8 liegt. Punkte zeigen die Öffnungszeiten des Ventils, das den Fluss von nicht-permissivem Medium kontrolliert, pro 24 Stunden. **B,** Wachstumsausbeuten von MG1655 und des evolvierten Derivats in Gegenwart von unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen in *batch*-Kultur nach 24 Stunden. Weitere Erläuterungen im Text.

als drei Jahren durchgeführt haben, unterstreicht die Robustheit der Technologie.

Anwendungsbeispiel: experimentelle Evolution von Halotoleranz in *E. coli*

Im Folgenden ist ein Beispiel für die gerichtete Evolution von *E. coli* dargestellt (**Abb. 3**): Eine Population von Zellen wurde einer physikalischen Extremsituation – hoher Osmolarität – ausgesetzt, um ein halotolerantes Derivat zu erzeugen. Um automatisch ein Regime von gerade noch tolerierbaren osmotischen Bedingungen einzustellen, wurde das Kulturgefäß mit zwei Medienquellen verbunden, von denen eine ein „permissives“ (Wachstum erlaubendes) Medium niedriger Osmolarität enthält, die zweite ein „nicht-permissives Medium“ hoher Osmolarität, bei der die Bakterien nicht wachsen können. Liegt die Zelldichte unter einer definierten Schwelle, so wird die Kultur periodisch mit Pulsen von permissivem Medium verdünnt. Steigt die Zelldichte über diese Schwelle, so wird die Kultur stattdessen mit Pulsen von nicht-permissivem Medium verdünnt. Dadurch stellt sich automatisch eine für die am besten an hohe Osmolarität angepassten Varianten gerade noch tolerierbare Osmolarität ein. Diese Strategie bietet sich für die genetische Adaptation von Organismen an viele wachstumshemmende oder -limitierende Bedingungen an.

Abbildung 3 zeigt die Entwicklung der Salzkonzentration in der Kultur anhand der Anzahl von Verdünnungsereignissen mit nicht-permissivem Medium pro Zeiteinheit. Nach etwa 8.000 Generationen unter konti-

nuierlicher Selektion kann das evolvierte Derivat bei Konzentrationen von mehr als 1,6 M NaCl wachsen, während Wildtyp-Zellen bei 0,8 M NaCl gerade noch wachsen. Diese Zellen können nur in salzfreiem Medium wachsen, wenn sie über mehrere Passagen in absteigenden Osmolaritäten kultiviert werden. Im Verlauf dieses Experiments (etwa zum Zeitpunkt 500 Tage) hat die evolvierte Population von der Synthese und intrazellulären Akkumulation des Zuckers Trehalose (der Standardantwort auf osmotischen Stress in *E. coli*) auf die Produktion und Akkumulation hoher intrazellulärer Konzentrationen der osmoprotektiven Aminosäure Prolin „umgeschaltet“ (M. Khlaf und E. Ulbricht, unveröffentlichte Daten). Nach einer von Oren [11] formulierten Definition – ein halophiler Organismus wächst optimal bei Konzentrationen von 0,85 M NaCl und höher und toleriert Konzentrationen von wenigstens 1,7 M NaCl – ist dieses Derivat eines prototypischen mesophilen *E. coli*-Stamms auf gutem Wege, halophil zu werden. ■

Literatur

- [1] Monod J (1950) La technique de culture continue. Théorie et applications. Ann Inst Pasteur 19:390–410
- [2] Novick A, Szilard L (1950) Description of the chemostat. Science 112:715–716
- [3] Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial Selection. Science 116:43–51
- [4] Kubitschek HE (1970) Introduction to Research with Continuous Cultures. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey
- [5] Novick A (1955) Growth of bacteria. Ann Rev Microbiol 9:97–110
- [6] Chao L, Ramsdell G (1985) The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. J Gen Microbiol 131:1229–1236

- [7] Anderson PA (1953) Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms. J Gen Physiol 36:733–737
- [8] Barrick JE, Yu DS, Yoon SH et al. (2009) Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature 461:1243–1247
- [9] Marlière P, Mutzel R (2002) Verfahren und Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension. Patent DE 198 56 136 C2
- [10] Drake JW (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. Proc Natl Acad Sci USA 88:7160–7164
- [11] Oren A (2008) Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems 4:2
- [12] de Crécy-Lagard VA, Bellalou J, Mutzel R et al. (2001) Long term adaptation of a microbial population to a permanent metabolic constraint: overcoming thymineless death by experimental evolution of *Escherichia coli*. BMC Biotechnology 1:10



Rupert Mutzel (links) und Philippe Marlière

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Rupert Mutzel
 Institut für Biologie
 Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
 Freie Universität Berlin
 Königin-Luise-Straße 12–16
 D-14195 Berlin
 Tel.: 030-83853116
 Fax: 030-83857773
 rmutzel@zedat.fu-berlin.de
 www.biocircle.fu-berlin.de/mikrobio2