

Metabolic Engineering

Computergestütztes Design mikrobieller Zellfabriken

STEFFEN KLAMT, AXEL VON KAMP, BJÖRN-JOHANNES HARDER
ANALYSE UND REDESIGN BIOLOGISCHER NETZWERKE, MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR
DYNAMIK KOMPLEXER TECHNISCHER SYSTEME, MAGDEBURG

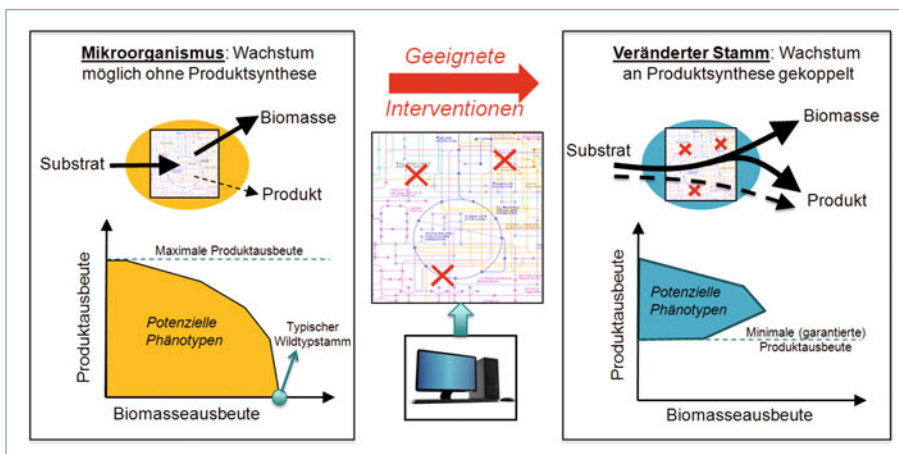
A key principle for the rational design of cell factories is the stoichiometric coupling of growth and product synthesis. Based on this approach we recently constructed an *Escherichia coli* strain producing itaconic acid with excellent yields. Furthermore, in a large-scale computational study we demonstrated that coupling of growth and production is, in principle, feasible for almost all metabolites in five major production organisms. These results are of fundamental importance for rational metabolic engineering in biotechnology.

DOI: 10.1007/s12268-019-1015-0
© Die Autoren 2019

Open Access

■ Mikroorganismen können ein breites Spektrum an Chemikalien und Biokraftstoffen synthetisieren und gewinnen in einer stärker biobasierten chemischen Industrie weiter an Bedeutung. Oftmals produzieren die Zellen die gewünschten Substanzen allerdings nicht von allein oder nicht effizient genug

und müssen daher z. B. durch geeignete genetische Eingriffe im Stoffwechsel zu Hochleistungsproduzenten umfunktioniert werden. Die Entwicklung mikrobieller Stämme mit optimiertem Stoffwechsel für biotechnologische Anwendungen ist ein zentrales Ziel des *Metabolic Engineering* [1, 2].



▲ **Abb. 1:** Prinzip der wachstumsgekoppelten Produktsynthese. Der Wildtyp eines Mikroorganismus synthetisiert ein gewünschtes Produkt oft zunächst gar nicht oder nur in geringer Ausbeute (links), weshalb er sich im Biomasse-Produkt-Ausbeutediagramm typischerweise in der rechten unteren Ecke wiederfindet (links unten). Mittels computergestützter Analyse werden Eingriffsstrategien im Stoffwechsel berechnet (Mitte), durch die Wachstum im veränderten Organismus stöchiometrisch nur noch möglich ist, wenn gleichzeitig das Produkt synthetisiert wird. Der zulässige Bereich aller möglichen Phänotypen der Mutante liegt somit über einer horizontalen Linie (= Mindestausbeute) im Ausbeutediagramm. Das Produkt selbst kann prinzipiell auch noch ohne Biomasse produziert werden.

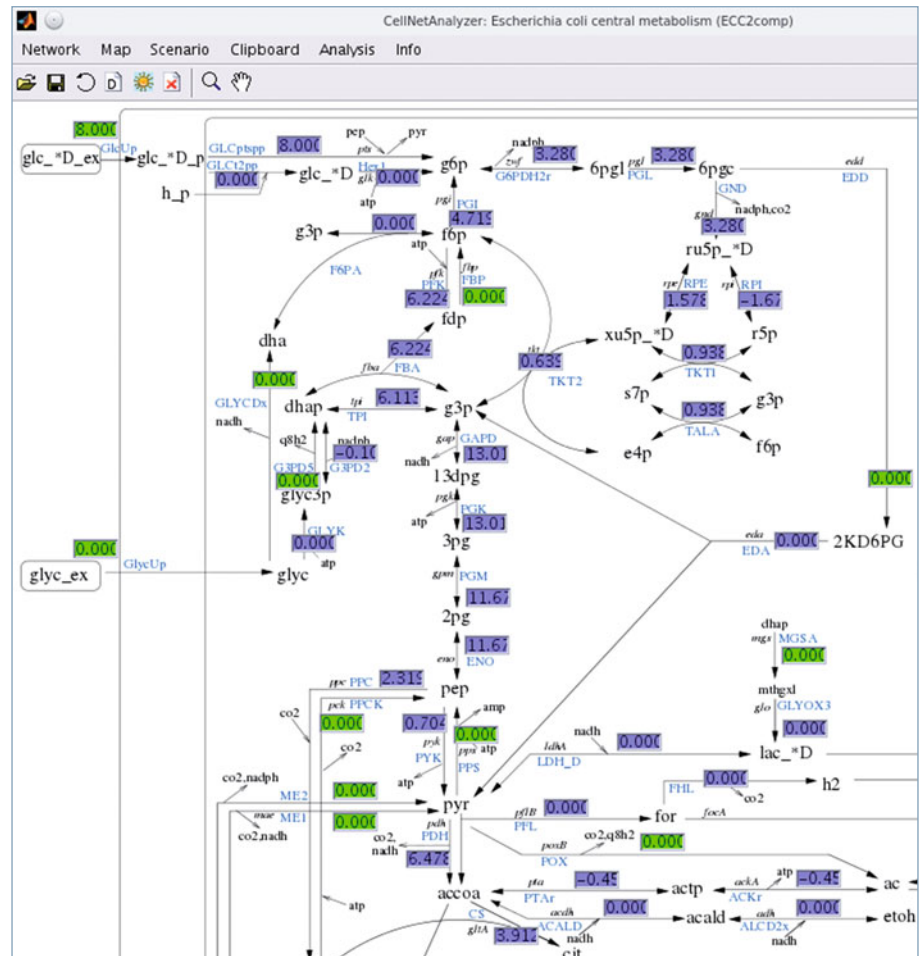
Der Stoffwechsel selbst von einfachen Mikroorganismen ist hochgradig komplex und umfasst in der Regel Hunderte oder Tausende Metaboliten und biochemische Reaktionen. Um im Labyrinth der sich daraus ergebenden Stoffwechselffade nicht den Überblick zu verlieren, ist der Einsatz von mathematischen Modellen und Computersimulationen unumgänglich. Häufig verwendet man dafür stöchiometrische Modelle, mit denen sich relevante metabolische Flussverteilungen analysieren lassen, z. B. von der Substrataufnahme bis zur Synthese von Biomasse oder von bestimmten Produkten [3]. Diese Modelle helfen bei der Identifikation von Stoffwechselwegen und tragen zu einem grundsätzlich besseren Verständnis des Metabolismus bei. Darüber hinaus können sie eine wichtige Unterstützung bei der Suche nach Kombinationen von genetischen Eingriffen sein, die eine Mikrobenzelle in eine biochemische Fabrik zur Synthese eines gewünschten Produkts umwandeln. Derartige rationale Ansätze stellen eine Alternative oder Ergänzung zu zufallsbasierten Verfahren (Mutagenese) des Stammdesigns dar.

Ein wichtiges Prinzip des Stammdesigns basiert auf der Suche nach Interventionen, bei der das Wachstum der Zelle obligatorisch mit der Synthese des Produkts gekoppelt wird (**Abb. 1**, [4]). Die Zelle kann sich dann nur noch vermehren, wenn die gewünschte Chemikalie als essenzielles Nebenprodukt entsteht. Eine solche Kopplung läuft beispielsweise in natürlicher Art und Weise ab, wenn Hefen unter Sauerstoffausschluss das Gärprodukt Alkohol produzieren (müssen), um eine ausgeglichene Redoxbilanz zu bewahren. Da Mikroorganismen meistens nach maximalem Wachstum streben, vereinen die Ingenieure dadurch geschickt ihre Interessen mit denen der Mikroorganismen. Stämme mit einer derartigen Kopplung können durch adaptive Evolution im Labor in Richtung maximaler Wachstumsrate und damit – gekoppelt – zu höherer Produktsynthese optimiert werden [5].

Anwendungsbeispiel: *Escherichia coli* als Itaconsäure-Produzent

Unter Anwendung der oben beschriebenen Kopplungsstrategie konstruierte unsere Gruppe einen Stamm des Bakteriums *Escherichia coli*, der Itaconsäure mit bisher unerreichter Ausbeute aus Glucose produziert [6]. Dabei handelt es sich um eine wichtige Plattformchemikalie, aus der viele weitere Chemikalien synthetisiert werden können. Der *E. coli*-Wildtyp kann Itaconsäure nicht produzieren, da er das Gen für die *cis*-Aconitat-Decarboxylase, dem letzten Schritt der Itaconsäuresynthese, nicht besitzt. Daher brachten wir das Gen aus einem anderen Organismus, dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* (ein natürlicher Produzent von Itaconsäure), in *E. coli* ein. Danach kamen Methoden des modellgestützten Stammdesigns zum Einsatz: Mit Hilfe eines Modells des Zentralstoffwechsels in *E. coli* und unter Einsatz von Algorithmen in der von uns entwickelten Software *CellNetAnalyzer* (Abb. 2, [7]) berechneten wir Kombinationen von genetischen Eingriffen, die zur wachstumsgekoppelten Synthese von Itaconsäure führen. Diese *in silico*-Interventionsstrategien werden *minimal cut sets* genannt. Wir wählten eine dieser gefundenen Strategien für die Umsetzung aus, bei der fünf Gene für metabolische Enzyme entfernt und dadurch bestimmte Stoffwechselwege in *E. coli* blockiert wurden. Der konstruierte Stamm ita23 (Abb. 3, oben) zeigt das gewünschte Verhalten und produziert während des Wachstums Itaconsäure in großer Menge als Nebenprodukt. In Versuchen in Bioreaktoren wird pro mol eingesetzter Glucose 0,68 mol Itaconsäure produziert, was 68 Prozent der maximalen Ausbeute entspricht.

Der erzeugte Stamm liefert somit eine sehr hohe Ausbeute, die weit über andere bisher publizierte Ergebnisse von heterologen Produzenten hinausgeht und schon recht nahe an der maximalen Ausbeute (80 Prozent) des natürlichen Produzenten *A. terreus* liegt. Allerdings ist die volumetrische Rate (gebildete Produktmenge je Stunde und Liter Reaktorvolumen) noch relativ gering. Das ist damit zu erklären, dass die Biomasse, die als Biokatalysator benötigt wird, nur langsam akkumuliert, da ein hoher Anteil des Substrats gerade in das synthetisierte Produkt wandert. Eine Möglichkeit, diesen unvermeidlichen Konflikt (*Trade-off*) zwischen hoher Ausbeute und hoher Produktivität zu umgehen, besteht darin, einen zweistufigen Prozess zu konstruieren, in dem die Zellen zunächst



▲ **Abb. 2:** Ausschnitt aus der grafischen Benutzeroberfläche der Software *CellNetAnalyzer*. Dargestellt ist hier ein Ausschnitt eines Stoffwechselmodells von *Escherichia coli*. Die Textboxen zeigen berechnete Stoffflüsse (Umsatzraten der Reaktionen) an.

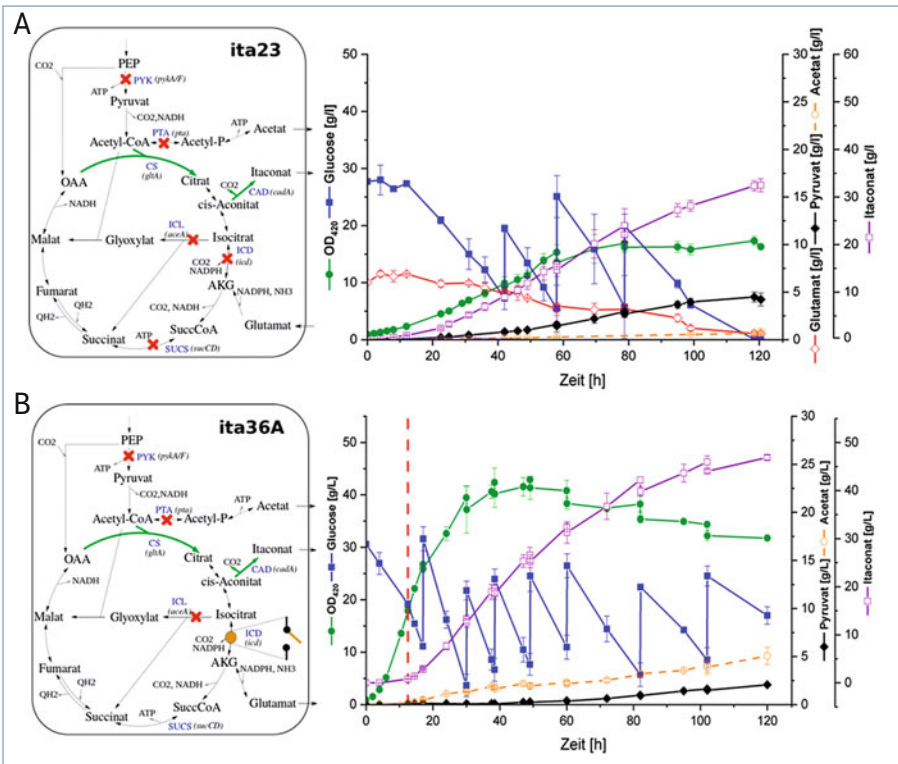
schnell wachsen können, bevor durch einen metabolischen Schalter auf Produktion umgestellt wird [8, 9]. Ausgehend von dem bereits konstruierten *E. coli*-Stamm ita23 und auf der Basis eines temperaturabhängigen genetischen Schalters erstellten wir eine Mutante mit derartiger Funktionalität (Abb. 3, unten; Stamm ita36, [10]). In der ersten Phase wachsen diese Zellen schnell. Nach genügender Akkumulation von Biomasse unterbricht der genetische Schalter aufgrund der extern reduzierten Temperatur den Citronensäurezyklus, wodurch die Synthese von Itaconsäure wieder erzwungen wird. In Bioreaktoren konnten wir den Titer und die volumetrische Produktivität der Itaconsäuresynthese mit diesem Ansatz um 46 Prozent steigern.

Wachstumsgekoppelte Überproduktion ist fast universell möglich

Das konkrete Anwendungsbeispiel der Itaconsäuresynthese durch *E. coli* demonstriert das Potenzial der Kopplungsstrategie. Ver-

schiedene Forschergruppen wiesen auch für andere ausgewählte Produkte nach, dass eine Kopplung von Wachstum und Produktsynthese erzwungen werden kann. Bisher war aber unklar, inwieweit sich ein solches Designprinzip grundsätzlich auf ein breites Spektrum von Produktklassen und Mikroorganismen anwenden lässt.

Dieser Frage sind wir in einer rechnergestützten Studie systematisch nachgegangen [4]. In fünf der wichtigsten biotechnologischen Produktionsorganismen untersuchten wir, für welche Metaboliten im jeweiligen Organismus eine mit Wachstum gekoppelte Synthese erzwungen werden kann. Zu den analysierten Organismen gehören klassische „Arbeitspferde“ der Biotechnologie, wie *E. coli*, die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, das Gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* und der filamentöse Pilz *Aspergillus niger*, aber auch exemplarisch eine Spezies photosynthetischer Bakterien (*Synechocystis* sp. PCC 6803).



▲ **Abb. 3:** Design und Performance von *Escherichia coli*-Stämmen für die wachstumsgekoppelte bzw. zweistufige Produktion von Itaconsäure. **A**, Wachstumsgekoppelte Produktion von Itaconat im Bioreaktor (Stamm ita23). **B**, zweistufige Produktion. Stamm ita36A mit temperaturabhängigem genetischem Schalter zur Kontrolle von Wachstum und Produktbildung. Der Übergang von der Wachstumsphase in die Produktionsphase ist durch die senkrechte, rot gestrichelte Linie (etwa bei 12 Stunden) angedeutet. Rote Kreuze in den Netzwerken von ita23 und ita36A verweisen auf Reaktionen, die durch Gendeletionen geblockt wurden. Grüne Pfeile deuten Reaktionen an, die aufgrund von genetischen Überexpressionen eine erhöhte Aktivität haben. Der orange Punkt im Stoffwechselnetzwerk von ita36A zeigt die Reaktion, die dynamisch reguliert wird (ICD: Isocitratdehydrogenase). Die Zugabe von Glucose im jeweiligen Fed-Batch-Prozess (blaue Linie) ist durch die sprunghafte Zunahme der Glucosekonzentration gekennzeichnet.

Für die aufwendigen Berechnungen von wachstumsgekoppelten Interventionsstrategien für Tausende von potenziellen Produkten in den fünf großskaligen Stoffwechselmodellen mussten wir zunächst noch effizientere Algorithmen entwickeln und in den *CellNetAnalyzer* integrieren. Danach konnten wir als zentrales und zugleich überraschendes Ergebnis schließlich zeigen, dass sich für fast jeden Metaboliten (mehr als 94 Prozent) in den fünf

Modellorganismen prinzipiell eine Interventionsstrategie finden lässt, die bei Wachstum eine signifikante Produktion des Metaboliten erzwingt [4]. Eine Kopplung ist dabei jeweils zumindest stöchiometrisch möglich. In der Realität werden natürlich auch viele weitere Aspekte, wie regulatorische und kinetische Eigenschaften der zugrunde liegenden metabolischen Pfade, eine Umsetzbarkeit der wachstumsgekoppelten Synthese beeinflussen. Da

die fünf Organismengruppen ein breites Spektrum von relevanten Produkten für die chemische Industrie abdecken (wie Biokraftstoffe, Biopolymere, Nahrungsergänzungsmittel oder Plattformchemikalien), sind diese Ergebnisse dennoch von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuer mikrobieller Stämme in der industriellen Biotechnologie.

Literatur

[1] Nielsen J, Lee SY (2018) Evolution of the metabolic engineering community. *Metab Eng* 48:A1–A2
 [2] Becker J, Wittmann C (2015) Advanced biotechnology: metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products. *Angew Chem Int Ed* 54:3328–3350
 [3] Bordbar A, Monk JM, King ZA et al. (2014) Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat Rev Genet* 15:107–120
 [4] von Kamp A, Klamt S (2017) Growth-coupled overproduction is feasible for almost all metabolites in five major production organisms. *Nat Commun* 8:15956
 [5] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K (2011) Adaptive laboratory evolution – harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol* 22:590–594
 [6] Harder B-J, Bettenbrock K, Klamt S (2016) Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Metab Eng* 38:29–37
 [7] von Kamp A, Thiele S, Hädicke O et al. (2017) Use of *CellNetAnalyzer* in biotechnology and metabolic engineering. *J Biotechnol* 261:221–228
 [8] Burg JM, Cooper CB, Ye Z et al. (2016) Large-scale bioprocesses competitiveness: the potential of dynamic metabolic control in two-stage fermentations. *Curr Opin Chem Eng* 14:121–136
 [9] Klamt S, Mahadevan R, Hädicke O (2018) When do two-stage processes outperform one-stage processes? *Biotechnol J* 13:1700539
 [10] Harder B-J, Bettenbrock K, Klamt S (2018) Temperature-dependent dynamic control of the TCA cycle increases volumetric productivity of itaconic acid production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 115:156–164

Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Open access funding provided by Max Planck Society.

Korrespondenzadresse:

Dr.-Ing. Steffen Klamt
 Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme
 Sandtorstraße 1
 D-39106 Magdeburg
 Tel.: 0391-6110-480
 klamt@mpi-magdeburg.mpg.de
 www.mpi-magdeburg.mpg.de/14969/arb

AUTOREN



Steffen Klamt
 Jahrgang 1972. 1992–1998 Studium der Angewandten Systemwissenschaft an der Universität Osnabrück. 1998–2005 Doktorarbeit und 2005–2008 Postdoc am Max-Planck-Institut (MPI) für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg. Promotion 2005 an der Universität Stuttgart. Seit 2009 Forschungsgruppenleiter „Analyse und Redesign Biologischer Netzwerke“ am MPI Magdeburg.



Björn-Johannes Harder
 Jahrgang 1987. 2008–2013 Biotechnologiestudium an der Universität Braunschweig. 2014–2018 Doktorarbeit und seit 2018 Postdoc am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg. Promotion an der Universität Magdeburg.



Axel von Kamp
 Jahrgang 1972. 1991–1998 Studium der Biologie und Naturwissenschaftlichen Informatik an der Universität Bielefeld. 1998–2002 Promotion an der Dublin City University, Irland. 2003–2007 Postdoc an der Universität Jena. Seit 2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg.