

Analyse der evolutiven Adaptation am Beispiel einer pyruvat-auxotrophen Escherichia coli-Mutante

Analysis of the Evolutive Adaptation of a Pyruvate-auxotrophic Escherichia coli Mutant

Ronny Feuer¹, Michael Ederer¹, Ernst Dieter Gilles, Georg A. Sprenger, Oliver Sawodny und Thomas Sauter

Die biotechnische Herstellung von Substanzen mit Hilfe von Mikroorganismen ist ein wirtschaftlich wichtiges Einsatzgebiet der Systembiologie. In diesem Artikel wird ein pyruvat-auxotropher *Escherichia coli*-Stamm eingesetzt, um durch evolutive Adaptation alternative Stoffwechselwege zum Pyruvat zu aktivieren. Das Ergebnis der Experimente sind pyruvat-prototrophe Stämme, die mit ihren alternativen Stoffwechselwegen als Grundlage für Produktionstämme eingesetzt werden können, um später damit gezielt in diesen Wegen auftretende Zwischenprodukte industriell herzustellen. Mit Hilfe eines einfachen dynamischen Modells wird die evolutive Adaptation im Chemostat untersucht. Es können dabei Einstellregeln für die Zulaufkonzentration und Verdünnungsrate im Bioreaktor zur beschleunigten Gewinnung pyruvat-prototroper Stämme geschlussfolgert werden. Die Flussbilanzanalyse des metabolischen Netzwerkes des pyruvat-auxotrophen Stammes ergibt 20 verschiedene alternative Flussverteilungen. Zur übersichtlichen Darstellung solcher Flussverteilungen wird eine reduzierte Visualisierungsmethode vorgestellt.

The biotechnological production of substances with help of microorganisms is an economically important application of systems biology. In this paper a pyruvate-auxotrophic *Escherichia coli*-strain is utilized in order to activate alternative pyruvate synthesis pathways via evolutive adaptation. The outcome of the chemostat experiments are pyruvate-prototrophic strains. Due to the activated alternative synthesis pathways, these strains are a basis for future industrial production-strains in order to systematically produce the intermediate products on these pathways. By means of a simple dynamical model of a chemostat, the evolutive adaptation in chemostat mode is studied. Rules to adjust the feeding concentration and the dilution rate of the bioreactor could be obtained in order to accelerate the evolutive adaptation towards a pyruvate-prototrophic strain. A flux balance analysis of the metabolic network of the pyruvate-auxotrophic strain results in 20 different alternative pathways. For a well arranged presentation of those pathways a reduced visualization method is introduced.

Schlagwörter: Systembiologie, Evolutive Adaptation, Flussbilanzanalyse, Visualisierung von Flussverteilungen

Keywords: Systems biology, evolutive adaptation, flux balance analysis, visualization of flux distributions

1 Einleitung

In den vergangenen Jahren hat der massive Fortschritt in den Biowissenschaften zunehmend auch neue Heraus-

forderungen für die Ingenieurwissenschaften geschaffen [1]. Die Kooperation zwischen Biologie und Systemwissenschaften birgt dabei neue Lösungsansätze und das Potential, die hoch komplexen biologischen Systeme zu handhaben, z. B. mit nützlichen Modellierungswerkzeugen [2; 3]. So haben sich bereits zahlreiche systemtheore-

¹ Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Forschungsarbeit beigetragen.

tische Methoden fest in der Biotechnologie etabliert. Die Optimierung des Mikroorganismus hin zur effizienten Umsetzung von Substraten in ein Produkt ist hierbei eine Voraussetzung für die industrielle Produktion organischer Substanzen durch Mikroorganismen. Herkömmliche Methoden für die Erstellung eines mikrobiologischen Produktionsstammes sind selektive Züchtung („selective breeding“) oder klassische Stammverbesserung mittels zufälliger Mutationen und Selektion [4]. Die evolutive Adaptation stellt eine neuartige Alternative zu diesen arbeitsaufwendigen Methoden dar. Dabei wird in einem Chemostat der evolutive Trend der Mikroorganismen zur optimalen Ausbeute eines limitierenden Substrates ausgenutzt, um die Produktion eines gewünschten Produktes zu steigern. Die Optimierung des Organismus geschieht hierbei durch genetische Mutation und durch die im Fermentationsprozess gesteuerte Auslese. Als Antwort des Stoffwechsels auf Gendeletionen ist durch evolutive Adaptation eine Umorganisation der Stoffwechselwege zu erwarten [5].

Evolutive Adaptation im Chemostat

Ein Chemostat ist ein Bioreaktor mit einem konstanten Zufluss von Medium $Q[\text{m}^3 \text{ h}^{-1}]$ und einem Abfluss von Reaktorinhalt im gleichen Maße (Bild 1). Der Chemostat ermöglicht die Kultivierung von Mikroorganismen unter konstanten Bedingungen. Die Verdünnungsrate $D[\text{h}^{-1}] = QV^{-1}$ mit dem Reaktorvolumen $V[\text{m}^3]$ entspricht dabei der Wachstumsrate, die die Mikroorganismen realisieren müssen, um die beständige Ausdünnung zu kompensieren. Im stationären Zustand befinden sich die Mikroorganismen in einer konstanten Wachstumsphase und sofern die Verdünnungsrate die Möglichkeiten des Organismus nicht übersteigt, wird die Biomasse im Reaktor im Wesentlichen durch die Ausbeute bezüglich des limitierenden Substrates bestimmt. Je weniger Substrat für die Bildung von Biomasse benötigt wird, desto höher ist die Ausbeute, angegeben in mmol pro Gramm Trockenmasse pro Stunde [$\text{mmol gDCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$].

Durch zufällige Mutationereignisse können Mutanten eine höhere Ausbeute bezüglich des limitierenden Substrates

erlangen und können sich dadurch im Fermenter gegen den etablierten Stamm durchsetzen (Bild 1, rechts). Dieser Vorgang wird als evolutive Adaptation bezeichnet [6] und wurde zum Beispiel in [7] bei Wachstum auf Glycerin untersucht und in [8] wurde der Einfluss der Laktoseverwertung auf das evolutionäre Verhalten studiert.

In unserem Experiment wird eine *Escherichia coli* (*E. coli*)-Mutante eingesetzt, deren Hauptreaktionswege zum Pyruvat durch Einführung von Mutationen unterbrochen sind. Pyruvat ist ein sehr wichtiger Metabolit im metabolischen Netzwerk einer Zelle. Es ist ein Vorläufermolekül für mehrere Aminosäuren und befüllt zudem den Tricarbonsäurezyklus. Die *E. coli*-Mutante ist durch die eingeführten Mutationen pyruvat-auxotroph, d. h. sie benötigt neben der Hauptkohlenstoffquelle Glycerin zusätzlich eine externe Pyruvatquelle. Laktat kann zu Pyruvat verstoffwechselt werden und so erlaubt die Zugabe von Laktat als Pyruvatquelle das Wachstum der pyruvat-prototrophen Mutante. Diese Abhängigkeit der *E. coli*-Mutante von der externen Pyruvatquelle kann nun zur Ausübung eines evolutionären Druckes genutzt werden, der zu einer Aktivierung alternativer, intrazellulärer (endogener) Stoffwechselwege zum Pyruvat führt. Am Ende eines Experiments wird sich auf diese Weise eine pyruvat-prototrophe Mutante durchgesetzt haben. Das Wachstum dieser Mutante ist dann durch die Hauptkohlenstoffquelle Glycerin limitiert.

Viele alternative Stoffwechselwege zum Pyruvat führen über biotechnologisch interessante Zwischenprodukte, wie z. B. die Aminosäuren Serin und Tryptophan, sowie Chorismat. Die Produktion des zellinternen Pyruvats ist nicht Ziel, sondern Mittel, um die Überproduktion von relevanten Stoffen auf alternativen Stoffwechselwegen zum Pyruvat anzuregen. Ein Stamm, der wie oben beschrieben durch evolutive Adaptation gewonnen wurde, kann als Grundlage für einen industriellen Produktionsstamm verwendet werden.

Der Schwerpunkt dieses Artikels liegt in der vorbereitenden und unterstützenden Analyse der evolutiven Adaptation im Chemostat, um eine optimale Prozessführung zu realisieren, und in der Analyse der möglichen alternativen Stoffwechselwege zum Pyruvat.

2 Modellierung

Zunächst werden die Eigenschaften der evolutiven Adaptation im Chemostat untersucht. Die Erkenntnisse werden in Hinblick auf die Prozessführung nützlich sein, sowie für die Wahl der Zielfunktion, die später zur Optimierung des im Abschnitt 2.2 eingeführten metabolischen Netzwerkes benötigt wird.

2.1 Ausgangsstamm und Mutante im Chemostat

Um die Dynamik der evolutiven Adaptation zu verstehen, untersuchen wir ein einfaches Modell eines Chemostaten mit zwei unterschiedlichen Stämmen. Auf Grundlage dieses

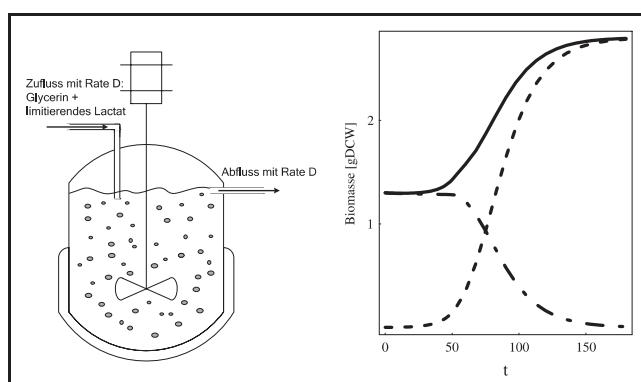


Bild 1: Links: Bioreaktor im Chemostatmodus. Rechts: Entwicklung der Biomasse (durchgehende Linie) wenn sich eine Mutante mit höherer Ausbeute (gestrichelt) gegen eine etablierte Mutante (strich-punkt) durchsetzt.

Modells können wir Aussagen über die evolutive Gütefunktion im Chemostaten und dementsprechend über die optimale Prozessführung gewinnen.

2.1.1 Modell

Im Folgenden leiten wir ein Modell für einen Chemostaten mit zwei unterschiedlichen Bakterienpopulationen her (siehe auch hierzu [9]). Population 1 ist der Ausgangsstamm und Population 2 eine Mutante in der Minderheit, die sich nur durch einen evolutionären Vorteil durchsetzen kann.

Wir nehmen an, dass Substrat S limitierend ist. S ist in unserem Fall Laktat. Die Bilanzgleichung für das Substrat S lautet:

$$\dot{c}_S = -J_1 c_{X,1} - J_2 c_{X,2} + D(c_{S,zu} - c_s). \quad (1a)$$

Hierbei ist c_S [mmol L^{-1}] die Substratkonzentration im Medium, $c_{S,zu}$ [mmol L^{-1}] die Substratkonzentration im Zulauf, $c_{X,i}$ [gDCW L^{-1}] die Konzentration der Trockenbiomasse (Dry Cell Weight DCW) und J_i [$\text{mmol gDCW}^{-1} \text{h}^{-1}$] die spezifische Substrat-Aufnahmerate der Population $i \in \{1, 2\}$. Die Verdünnungsrate D [h^{-1}] ist gegeben durch $D = Q/V$. Entsprechend wird die Biomasse beider Populationen $i \in \{1, 2\}$ bilanziert:

$$\dot{c}_{X,i} = \mu_i c_{X,i} - D c_{X,i}. \quad (1b)$$

Hierbei ist μ_i [h^{-1}] die spezifische Wachstumsrate von Population i .

Nimmt man an, dass die zellinternen Prozesse quasistationär sind, so folgt ein direkter Zusammenhang zwischen Substrataufnahme und Wachstum:

$$\mu_i = Y_i J_i. \quad (1c)$$

Hierbei ist Y_i [gDCW mmol^{-1}] der Ausbeutekoeffizient von Population i . Der Wert der Ausbeutekoeffizienten wird von den benutzten intrazellulären Stoffwechselpfaden bestimmt. Wir betrachten Y_1 und Y_2 hier vorerst als konstante, phänomenologische Parameter.

Für die Aufnahmerate J_i verwenden wir hier den Standardansatz nach Monod [10]:

$$J_i(c_S) = \frac{J_{max,i} c_S}{c_S + k_{m,i}}. \quad (1d)$$

Hierbei ist $J_{max,i}$ der Maximalwert der Substrataufnahmerate J_i und $k_{m,i}$ der Wert der Substratkonzentration, bei dem sich eine halb-maximal Aufnahme ($J_i = J_{max,i}/2$) einstellt.

Eine Population $i \in \{1, 2\}$ wird also insgesamt durch drei positive Parameter beschrieben: (1) Der Ausbeutekoeffizient Y_i gibt an, wieviel Gramm Biomasse pro aufgenommenem Milli-Mol Substrat gebildet wird; (2) die maximale Aufnahmerate $J_{max,i}$ gibt an, wieviel Milli-Mol Substrat ein Gramm Biomasse bei sehr großer Substratkonzentration $c_S \rightarrow \infty$ aufnimmt; (3) der Wert $k_{m,i}$ gibt an, bei welcher

Substratkonzentration die Aufnahmerate die Hälfte ihres Maximalwerts erreicht.

Der Chemostat ist durch zwei positive Größen charakterisiert: (1) Die Verdünnungsrate D und (2) die Konzentration $c_{S,zu}$ von S im Zulauf. Beide können durch den Experimentator eingestellt werden. Sie stellen damit technisch zugängliche Eingänge in das System dar.

2.1.2 Ruhelagen und Stabilität

Das obige Modell beschreibt die Dynamik zweier genetisch unterschiedlicher Stämme in einem Reaktor. Wir nehmen an, dass neue Mutanten mit verändertem Y , J_{max} und k_m langsam im Vergleich zur Chemostatdynamik entstehen und wir deshalb den Chemostat als quasi-stationär betrachten können. Im Folgenden betrachten wir die Ruhelagen $\dot{c}_S = \dot{c}_{X,1} = \dot{c}_{X,2} = 0$ des Modells in Gleichungen (1) und ermitteln deren Stabilitätseigenschaften.

Invarianz des nicht-negativen Orthanten. Da Konzentrationen immer nicht-negativ sind, kann sich das System nur im nicht-negativen Orthanten $c_{X,1}, c_{X,2}, c_S \geq 0$ bewegen. Dieser ist invariant, da für $D, c_{S,zu}, Y_i, J_{max,i}, k_{m,i} > 0$ gilt

$$c_{X,i} = 0 \Rightarrow \dot{c}_{X,i} = 0, \quad c_S = 0 \Rightarrow \dot{c}_S > 0. \quad (2)$$

Die folgenden Überlegungen können sich also auf den nicht-negativen Orthanten beschränken.

Reduktion auf zwei Dimensionen. Die Größe $s = c_S + c_{X,1}/Y_1 + c_{X,2}/Y_2$ beschreibt die Summe aus freiem Substrat und zu Biomasse umgesetztem Substrat im Reaktor. Mit Gleichungen (1) erhalten wir

$$\dot{s} = D(c_{S,zu} - s). \quad (3)$$

Diese Gleichung ist entkoppelt von anderen Zustandsgrößen und beschreibt den Verdünnungs-Mode des Systems. Da $\lim_{t \rightarrow \infty} s \rightarrow c_{S,zu}$ ist, können wir für die weitere Untersuchung der Ruhelagen das System auf der Ebene $c_S + c_{X,1}/Y_1 + c_{X,2}/Y_2 = c_{S,zu}$ betrachten. Mit $c_S = c_{S,zu} - c_{X,1}/Y_1 - c_{X,2}/Y_2$ reduzieren wir das ursprünglich dreidimensionale System in Gleichungen (1) auf folgendes zwei-dimensionale System mit $i \in \{1, 2\}$:

$$\dot{c}_{X,i} = (\mu_i - D) c_{X,i} \\ \text{mit } \mu_i = \frac{Y_i J_{max,i} (c_{S,zu} - c_{X,1}/Y_1 - c_{X,2}/Y_2)}{c_{S,zu} - c_{X,1}/Y_1 - c_{X,2}/Y_2 + k_{m,i}}. \quad (4)$$

Da $c_{X,1}, c_{X,2}, c_S, c_{S,zu} \geq 0$ gilt, sind die Trajektorien im reduzierten System auf $c_{X,1}/Y_1 + c_{X,2}/Y_2 \leq c_{S,zu}$ und $c_S \leq c_{S,zu}$ beschränkt.

Stationäre Punkte. Aus $\dot{c}_{X,i} = (\mu_i - D) c_{X,i}$ folgt, dass stationär ($\dot{c}_{X,i} = 0$) für Population i entweder $c_{X,i} = 0$ oder $\mu_i = D$ gilt. Für $\mu_i = D$ ist die stationäre Substratkonzentration:

$$\hat{c}_{S,i} := \frac{D k_{m,i}}{J_{max,i} Y_i - D}. \quad (5)$$

Da $0 \leq c_S \leq c_{S,zu}$ gilt, existiert eine positive Ruhelage mit $\mu_i = D$ und $c_{X,i} > 0$ nur für $0 < \hat{c}_{S,i} < c_{S,zu}$. Eine dauerhafte Koexistenz beider Populationen ($c_{X,1} > 0$ und $c_{X,2} > 0$) ist nur für $\hat{c}_{S,1} = \hat{c}_{S,2}$ möglich. Damit ist $\hat{c}_{S,i}$ eine wichtige Kenngröße für die Überlebensfähigkeit und die evolutive Kompetitivität einer Population im Chemostat. Insgesamt gibt es vier Klassen von Fixpunkten: (0) totales Auswaschen aus dem Chemostat, (1) Überleben von Population 1, (2) Überleben von Population 2 und (1&2) Koexistenz beider Population. Diese sind mit den oben abgeleiteten Existenzbedingungen in Tabelle 1 zusammengefasst.

Lokale Stabilität. Zur Untersuchung der lokalen Stabilität der gefundenen Ruhelagen untersuchen wir die Eigenwerte der Jacobimatrix des Systems in (4). Die Jacobimatrix ist gegeben durch

$$\frac{\partial \dot{c}_X}{\partial c_X} = \begin{pmatrix} \mu_1 - D + \mu_{11} c_{X,1} & \mu_{12} c_{X,1} \\ \mu_{21} c_{X,2} & \mu_2 - D + \mu_{22} c_{X,2} \end{pmatrix} \quad (6)$$

mit

$$\begin{aligned} \mu_{ij} := \frac{\partial \mu_i}{\partial c_{X,j}} = \\ = -\frac{Y_i}{Y_j} \underbrace{\frac{J_{max,i} k_{m,i}}{\left(c_{S,zu} - \frac{c_{X,1}}{Y_1} - \frac{c_{X,2}}{Y_2} + k_{m,i}\right)^2}}. \end{aligned} \quad (7)$$

Tabelle 1 zeigt die Jacobimatrix, deren Eigenwerte und Eigenvektoren an den zuvor gefundenen Ruhelagen. Hierbei

tritt $\mu_i - D$ mehrmals als Eigenwert auf. Um das Vorzeichen von $\mu_i - D$ zu untersuchen, formen wir um:

$$\mu_i - D = D \frac{k_{m,i}}{k_{m,i} + c_S} \frac{c_S - \hat{c}_{S,i}}{\hat{c}_{S,i}}. \quad (8)$$

Damit ist der entsprechende Eigenwert stabil ($\mu_i - D < 0$), wenn

$$\mu_i - D < 0 \equiv \hat{c}_{S,i} < 0 \vee \hat{c}_{S,i} > c_S. \quad (9)$$

Damit und unter Beachtung von $\mu_{ij} < 0$ sind die in Tabelle 1 angegebenen Stabilitätseigenschaften abgeleitet.

Globale Stabilität. Tabelle 1 zeigt, dass für $\hat{c}_{S,1} \neq \hat{c}_{S,2}$ eine bis drei Ruhelagen existieren, von denen jeweils genau eine stabil ist. Da die Ruhelagen alle auf dem Rand des Zustandsraums liegen, ist die Grenzmenge kein Zyklus. Dieser Schluss ist möglich, da das reduzierte System zwei-dimensional ist. Ein Zyklus erfordert im Zweidimensionalen eine Ruhelage im Inneren. Da das Gebiet, in dem sich die Trajektorien bewegen können, beschränkt und invariant ist, können keine Trajektorien entweichen. Für $\hat{c}_{S,1} \neq \hat{c}_{S,2}$ ist deshalb die lokale stabile Ruhelage auch global attraktiv für alle $c_{x,i}(t=0) > 0$. Eine analoge Argumentation führt im Fall $\hat{c}_{S,1} = \hat{c}_{S,2}$ auf die globale Attraktivität der Menge $c_{X,1}/Y_1 + c_{X,2}/Y_2 = c_{S,zu} - \hat{c}_S$.

Trajektorien in der Phasenebene. In Bild 2 sind Phasenbilder des Modells in Gleichungen (1) für vier qualitativ unterschiedliche Parameterwerte abgebildet: (1) Keine Population überlebensfähig, (2) nur eine Population überlebensfähig, (3) beide Populationen überlebensfähig (eine überlegene Population) und (4) beide Populationen überlebensfähig (Koexistenz).

Tabelle 1: Ruhelagen mit Existenzbedingungen und Stabilitätseigenschaften des Chemostatmodells in Gleichungen (1).

| (0) | (1) | (2) | (1&2) |
|--|---|---|--|
| Lage: | | | |
| $c_{X,1} = 0$ | $c_{X,1} = Y_1(c_{S,zu} - \hat{c}_{S,1})$ | $c_{X,1} = 0$ | $c_{X,1}/Y_1 + c_{X,2}/Y_2 =$ |
| $c_{X,2} = 0$ | $c_{X,2} = 0$ | $c_{X,2} = Y_2(c_{S,zu} - \hat{c}_{S,2})$ | $= c_{S,zu} - \hat{c}_S$ |
| $c_S = c_{S,zu}$ | $c_S = \hat{c}_{S,1}$ | $c_S = \hat{c}_{S,2}$ | $c_S = \hat{c}_{S,1} = \hat{c}_{S,2}$ |
| Existenzbedingung: | | | |
| – | $0 < \hat{c}_{S,1} < c_{S,zu}$ | $0 < \hat{c}_{S,2} < c_{S,zu}$ | $0 < \hat{c}_{S,1} = \hat{c}_{S,2} < c_{S,zu}$ |
| Jacobi-Matrix $A = \partial \dot{c}_X / \partial c_X$ von Gleichungen (4): | | | |
| $\begin{pmatrix} \mu_1 - D & 0 \\ 0 & \mu_2 - D \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} \mu_{11} c_{X,1} & \mu_{12} c_{X,1} \\ 0 & \mu_2 - D \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} \mu_1 - D & 0 \\ \mu_{21} c_{X,2} & \mu_{22} c_{X,2} \end{pmatrix}$ | $\begin{pmatrix} \mu_{11} c_{X,1} & \mu_{12} c_{X,1} \\ \mu_{21} c_{X,2} & \mu_{22} c_{X,2} \end{pmatrix}$ |
| Eigenwerte λ_k mit $ A - \lambda_k I = 0$: | | | |
| $\lambda_1 = \mu_1 - D$ | $\lambda_1 = \mu_2 - D$ | $\lambda_1 = \mu_1 - D$ | $\lambda_1 = 0$ |
| $\lambda_2 = \mu_2 - D$ | $\lambda_2 = \mu_{11} c_{X,1} < 0$ | $\lambda_2 = \mu_{22} c_{X,2} < 0$ | $\lambda_2 = \mu_{11} c_{X,1} + \mu_{22} c_{X,2} < 0$ |
| Eigenvektoren v_k mit $A v_k = \lambda_k v_k$: | | | |
| $v_1^T = (1, 0)$ | $v_1^T = \left(\frac{Y_1}{Y_2} \mu_{11}, \frac{\mu_2 - D}{c_{X,1}} - \mu_{11}\right)$ | $v_1^T = \left(\frac{\mu_1 - D}{c_{X,2}} - \mu_{22}, \frac{Y_2}{Y_1} \mu_{22}\right)$ | $v_1^T = (Y_1, -Y_2)$ |
| $v_2^T = (0, 1)$ | $v_2^T = (1, 0)$ | $v_2^T = (0, 1)$ | $v_2^T = (\mu_{11} c_{X,1} Y_1, \mu_{22} c_{X,2} Y_2)$ |
| Lokal stabil ($\lambda_1, \lambda_2 < 0$) für: | | | |
| $\hat{c}_{S,i} < 0 \vee c_{S,zu} < \hat{c}_{S,i}$ | $\hat{c}_{S,2} < 0 \vee \hat{c}_{S,1} < \hat{c}_{S,2}$ | $\hat{c}_{S,1} < 0 \vee \hat{c}_{S,2} < \hat{c}_{S,1}$ | – |

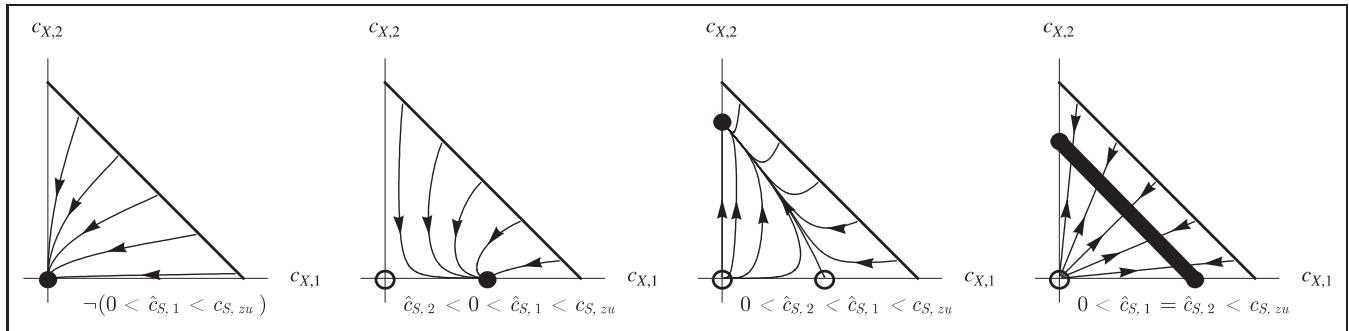


Bild 2: Trajektorien in der $c_{X,1}$ - $c_{X,2}$ -Phasenebene des Modells in Gleichungen (4) für vier qualitativ unterschiedliche Fälle. Gefüllte Kreise (●) bezeichnen stabile und offene Kreise (○) bezeichnen instabile Ruhelagen. Der schwarze Balken im letzten Bild bezeichnet ein Kontinuum von stabilen Ruhelagen.

Evulsive Gütfunktion. Obige Überlegungen zeigen, dass die Kenngröße \hat{c}_S die Überlebensfähigkeit und Kompetitivität einer Mutante beschreibt und deshalb als evulsive Gütfunktion verwendet werden kann. Hierbei stehen kleinere Werte für eine höhere Güte, da sich ein Stamm mit kleinerem \hat{c}_S gegen einen Stamm mit größerem \hat{c}_S durchsetzt. Die Parameter der dominanten Populationen werden sich durch Mutationen solange ändern, bis deren \hat{c}_S in Bezug auf physikalisch mögliche Werte von Y , J_{max} und k_m ein Minimum erreicht. Da \hat{c}_S für den im Reaktor dominanten Stamm gleich der sich einstellenden quasi-stationären Substratkonzentration ist, erwartet man während der evuliven Adaptation ein monotones Absinken der Konzentration des limitierenden Substrats S .

Bild 3 fasst die gewonnenen Erkenntnisse über die prinzipielle Überlebensfähigkeit einer Population und deren evulsive Fitness zusammen. Die gestrichelte Kurve ($a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$) in dieser Abbildung zeigt eine mögliche Trajektorie der evuliven Adaptation. Die evulsive Güte nimmt entlang dieser Trajektorie immer zu, da sie die Isolinien der Gütfunktion \hat{c}_S von links oben nach rechts unten schneidet. Beachtenswert ist, dass entlang einer solchen Trajektorie $\hat{\mu} = Y J_{max}$ nicht immer zunehmen muss und k_m nicht immer abnehmen muss. So nimmt von Punkt a zu b der Parameter k_m zu, und von b nach c nimmt $\hat{\mu} = Y J_{max}$ ab.

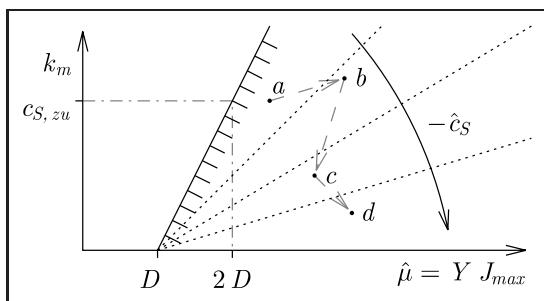


Bild 3: Darstellung der Gütfunktion der evuliven Adaptation im Chemostat. Rechts von der durchgezogenen Geraden ist stationäres Wachstum im Reaktor möglich, ohne dass die Population ausgewaschen wird. Die gepunkteten Geraden bezeichnen Isolinien der Gütfunktion \hat{c}_S , wobei nach rechts unten \hat{c}_S abnimmt und damit die Güte zunimmt. Die gestrichelte Kurve ($a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d$) zeigt eine mögliche Trajektorie der evuliven Anpassung. Die gestrichelt punktierten Linien dienen der Orientierung und ergeben sich aus (5).

2.1.3 Folgerungen für die Prozessführung

Aus obigen Ergebnissen können wir Regeln für die Prozessführung, d. h. die Einstellung der Verdünnungsrate D und der Konzentration des limitierenden Substrats im Zufluss $c_{S,zu}$ ableiten.

Evolutionsdruck auf Y . Stammverbesserung mittels evuliver Adaptation beruht, wie in der Einleitung erläutert, auf einer Kopplung einer Produktausbeute an die Biomasseausbeute Y des limitierenden Substrats. Letztere soll im Chemostat unter evulivem Druck stehen: Spontane Mutanten mit einem verringerten Y sollen ausgewaschen werden; Mutanten mit einem erhöhten Y sollen sich durchsetzen. Im vorherigen Abschnitt zeigten wir, dass die evulsive Güte einer Mutante aber nicht nur von der Biomasseausbeute Y , sondern auch von J_{max} und k_m abhängt. Im Folgenden diskutieren wir den Einfluss dieser Größen und stellen eine Prozessführungsstrategie vor, diesen zu minimieren.

Einfluss von J_{max} . Die Ausbeute Y und die maximale Aufnahmerate J_{max} treten immer als Produkt auf, so dass die Effekte dieser beiden Größen formal nicht zu trennen sind. Die maximale Aufnahmerate J_{max} ist allerdings durch die maximale Ablesegeschwindigkeit der Gene für die Substrataufnahme beschränkt. In unserem Fall ist die Ausbeute Y unbeschränkt, da durch Deregulation alternativer Pyruvat-Synthesewege der Bedarf an der externen Pyruvat-Quelle Laktat beliebig gesenkt werden kann. Das bedeutet, dass das Produkt $\hat{\mu} = Y J_{max}$ auf lange Sicht im Wesentlichen von Y bestimmt wird.

Einfluss von k_m . Der evulsive Druck geht auch in Richtung niedrigerer k_m -Werte. Das ist insofern störend, als durch fallenden k_m ein Abfall in J_{max} Y ausgeglichen werden kann (siehe z. B. Punkte b und c in Bild 3). Das Auftreten einer solchen Situation ist wahrscheinlich, da ein niedrigeres k_m die Verfügbarkeit des Substrates in der Zelle erhöht und damit aufgrund zellinterner Regulationen andere Stoffwechselwege mit einer geringeren Ausbeute aktiviert werden. Da dies kontraproduktiv ist, sollten solche Situationen weitgehend durch die Prozessführung verhindert werden. In den folgenden Absätzen entwickeln wir hierzu eine Strategie zur Einstellung von D und $c_{S,zu}$.

Maximierung der Evolutionsgeschwindigkeit von Y . Entscheidend für die Geschwindigkeit der evuliven Anpas-

sung ist die Häufigkeit, mit der sich Mutanten mit verbessertem Y durchsetzen. Wie aus Bild 3 hervorgeht, können sich jedoch Mutanten mit verbessertem $\hat{\mu} = Y J_{max}$ nicht durchsetzen, wenn k_m gleichzeitig so weit größer wird, dass die neue Mutante oberhalb der aktuellen Isolinie von \hat{c}_S liegt. Wir formulieren ein Optimierungsproblem zur Minimierung dieses Effekts und damit zur Maximierung der Evolutionsgeschwindigkeit von $\hat{\mu}$. Da, wie oben erläutert, $\hat{\mu}$ im Wesentlichen von Y bestimmt wird, maximiert dies auch die Evolutionsgeschwindigkeit von Y . Es sei $\rho(\hat{\mu}, k_m)$ [$\text{gDCW}^{-1} \text{mmol}^{-1}$] die Wahrscheinlichkeitsdichte für das Auftreten einer neuen Mutante mit den Parametern $\hat{\mu} = J_{max} Y$ und k_m pro Gramm Biomasse und Stunde. Der momentan dominante Stamm habe die Parameter $\hat{\mu}^\circ$ und k_m° . Neue Mutanten mit den Parametern $\hat{\mu}$ und k_m setzen sich gegen den dominanten Stamm durch, wenn sie in Bild 3 unterhalb der aktuellen Isolinie $\hat{c}_S \leq \hat{c}_S^\circ$ liegen. Durch Integration über diesen Bereich erhalten wir somit den Erwartungswert Q für die evolutive Änderung von $\hat{\mu}$ pro Liter Reaktorvolumen und Stunde:

$$Q(D, c_{s,zu}) \left[\frac{\text{h}^{-1}}{\text{h L}} \right] = \\ = c_X^\circ \underbrace{\int_D^\infty \int_0^{k_m^\circ \frac{\hat{\mu}-D}{\hat{\mu}^\circ-D}} (\hat{\mu} - \hat{\mu}^\circ) \rho(\hat{\mu}, k_m) dk_m d\hat{\mu}}_I. \quad (10)$$

Ziel ist es, Q durch Einstellung der Chemostatparameter D^{opt} und $c_{s,zu}^{opt}$ zu maximieren. Dazu nehmen wir im Folgenden an, dass $Q(D^{opt}, c_{s,zu}^{opt}) > 0$ ist. Ob dies zutrifft, hängt von der unbekannten Dichte $\rho(\hat{\mu}, k_m)$ ab. Ist dies nicht der Fall, ist keine Stammverbesserung durch evolutive Adaptation möglich, da mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Verschlechterung von $\hat{\mu}$ auftritt.

Optimales $c_{s,zu}$. Der Erwartungswert Q wächst linear mit $c_{s,zu}$:

$$Q \sim c_X \sim Y_1 (c_{s,zu} - \hat{c}_S), \quad (11)$$

da die stationäre Konzentration c_X° linear mit $c_{s,zu}$ wächst, aber das Integral I unabhängig von $c_{s,zu}$ ist. Daraus folgt, dass $c_{s,zu}$ so hoch wie möglich – d. h. auf dem Rand des für $c_{s,zu}$ möglichen Bereichs – eingestellt werden muss, damit sich eine hohe Biomassekonzentration einstellt.

Optimales D . Der Erwartungswert $Q(D, c_{s,zu})$ in Gleichung (10) ist das Produkt zweier Faktoren: der Biomasse c_X° und des Integrals I . Die Durchflussrate D hat einen negativen Einfluss auf die Biomassekonzentration c_X° ($\partial c_X^\circ / \partial D < 0$). Überschreitet D eine Obergrenze, geht die Biomassekonzentration c_X° und damit Q gegen Null (Bild 4):

$$Q(D, c_{s,zu}) = 0 \text{ mit } D > \hat{D} = \frac{\hat{\mu}^\circ c_{s,zu}}{k_m + c_{s,zu}}. \quad (12)$$

Es gilt also $0 \leq D^{opt} < \hat{D}$. Der Wert des Integrals I wird von D positiv beeinflusst ($\partial I / \partial D \geq 0$), da mit wachsendem D die Steilheit der Isolinie von \hat{c}_S zunimmt und damit der Integrationsbereich über negative $(\hat{\mu} - \hat{\mu}^\circ)$ abnimmt und

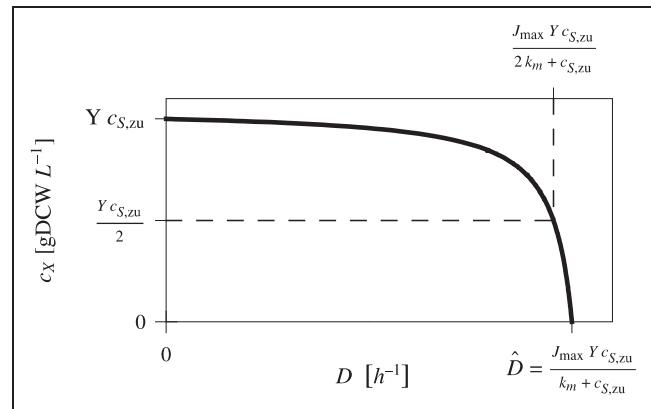


Bild 4: Stationäre Biomassekonzentration c_X über der Verdünnungsrate D .

über positive $(\hat{\mu} - \hat{\mu}^\circ)$ zunimmt. Der Optimalwert von D wird also durch das Gegenspiel seines Einflusses auf c_X° und die Steilheit der Isolinien von \hat{c}_S und damit den Wert des Integrals bestimmt. Die Dichte $\rho(\hat{\mu}, k_m)$ ist nicht bekannt, schwer zu ermitteln und vermutlich sehr stark vom aktuellen Genotyp abhängig. Trotzdem konnten wir folgern, dass zur Maximierung der Evolutionsgeschwindigkeit $c_{s,zu}$ maximal hoch gewählt werden muss und für D ein – wenn auch uns unbekanntes – Optimum existiert.

Heuristische Einstellregeln für D und $c_{s,zu}$. Obige theoretische Überlegungen sind durch die Unkenntnis von $\rho(\hat{\mu}, k_m)$ beschränkt. Dennoch können wir darauf aufbauend Regeln zur Einstellung von D und $c_{s,zu}$ herleiten. Wird die Zulaufkonzentration wie gefordert sehr groß gewählt ($c_{s,zu} \gg k_m$), ist die stationäre Biomasse c_X für eine kleine Verdünnungsrate D kaum, aber für D nahe der maximalen Durchflussrate sehr stark von D abhängig (Bild 4). Es ist nicht zweckmäßig, D in den steilen Bereich zu legen, da dort eine geringfügig zu große Einstellung oder kleine Störungen schnell zum völligen Auswaschen der Population führt. Eine solche Prozessführung wäre nicht robust. Das bedeutet, dass die Verdünnungsrate D möglichst nahe – aber nicht auf – den steilen Abfall gelegt werden sollte. Dann sind sowohl die Biomasse c_X als auch die Steigung der Isolinie von \hat{c}_S hoch. In diesem Fall wird die Biomasse c_X fast ausschließlich durch $c_{s,zu}$ bestimmt (siehe Bild 4). Wie oben erläutert, sollte $c_{s,zu}$ und damit c_X möglichst hoch eingestellt werden. Dies ist allerdings nur bis zu einer bestimmten Grenze sinnvoll. Für hohe Biomassekonzentrationen spielen weitere im Modell nicht berücksichtigte Effekte eine Rolle. So gehen die Zellen aufgrund unzureichender Belüftung teilweise in anaeroben Stoffwechsel über. Außerdem kann dann das bisher nicht-limitierende Glycerin limitierend werden, was zu einem völlig anderen Evolutionsdruck führen würde. Die Stellgröße $c_{s,zu}$ muss also benutzt werden, um die Biomasse c_X auf einen hohen, aber noch sinnvollen Wert einzustellen. Dies bedeutet, dass $c_{s,zu}$ im Laufe des Experiments abnimmt, da die Ausbeute Y steigt.

Aus der Modellanalyse leiten wir zusammenfassend folgende Faustregeln für die Prozessführung ab: Die Konzen-

tration des limitierenden Substrats im Zulauf $c_{S,zu}$ sollte benutzt werden, um die Biomassekonzentration c_X auf einen gewünschten Wert einzustellen. Die Einstellung von D muss iterativ erfolgen. Die Durchflussrate D wird in kleinen Schritten erhöht. Die zeitlichen Abstände werden so gewählt, dass die Reaktion der Biomasse abgeschätzt werden kann. Wird ein starker Abfall der Biomassekonzentration c_X beobachtet, so wird, bevor ein völliges Auswaschen stattfindet, zum letzten Schritt zurückgeschaltet. Dieses Vorgehen muss wiederholt werden, wenn sich eine neue Mutante im Reaktor durchgesetzt hat.

2.1.4 Zusammenfassung – Chemostatmodell

Obigen Überlegungen lag ein einfaches dynamisches Modell zugrunde, das einen Stamm über drei Parameter charakterisiert. Der für die Stammverbesserung durch evolutive Adaptation entscheidende Parameter ist die Ausbeute Y . Aus einer Stabilitätsanalyse der Ruhelagen konnten wir eine evolutive Gütfunktion \hat{c}_S in Abhängigkeit der stationären Substratkonzentration c_S . Das bedeutet, dass während der evolutiven Anpassung bei konstanten Chemostatparametern D und $c_{S,zu}$ die stationäre Substratkonzentration monoton abnimmt. Aufbauend auf der Gütfunktion \hat{c}_S , entwickelten wir eine Strategie zur Einstellung von D und $c_{S,zu}$, die den Evolutionsdruck auf Y und damit die Häufigkeit sich durchsetzender Mutanten mit verbessertem Y maximiert. Das Ergebnis, dass die Substratkonzentration im Zulauf $c_{S,zu}$ möglichst hoch gewählt werden soll, ist überraschend. Intuitiv wird oft davon ausgegangen, dass der Evolutionsdruck eher durch eine Absenkung des limitierenden Substrats erhöht wird.

Zur Validierung der obigen Prozessführungsstrategie führen wir Chemostatexperimente zur Stammverbesserung durch. Die vorgestellte Strategie zur Einstellung von D und $c_{S,zu}$ bewährte sich zur Herstellung von pyruvat-prototrophen Stämmen.

Die Ausbeute Y ist für die evolutive Adaptation der entscheidende Parameter. Bisher haben wir Y als phänotypologischen Parameter betrachtet. Der Wert der Ausbeute Y hängt jedoch von den benutzten zellinternen Stoffwechselwegen ab. Um zu einer detaillierteren Analyse der Ausbeute zu gelangen, beschäftigen wir uns im folgenden Abschnitt mit einem detaillierten Modell des Stoffwechselnetzwerkes von *E. coli*.

2.2 Metabolisches Netzwerk

Die Umwandlung externer Substrate, z. B. Glycerin, zum Pyruvat geschieht über viele enzymatisch katalysierte Reaktionsschritte. Im Bioreaktor müssen die Mikroorganismen aber nicht nur die Umwandlung von Glycerin zu Pyruvat bewältigen, sondern auch viele andere Metabolite generieren, um Wachstum zu bewerkstelligen. Diese stofflichen Umwandlungsprozesse können in einem stöchiometrischen Netzwerk modelliert werden, wie in Bild 5 für

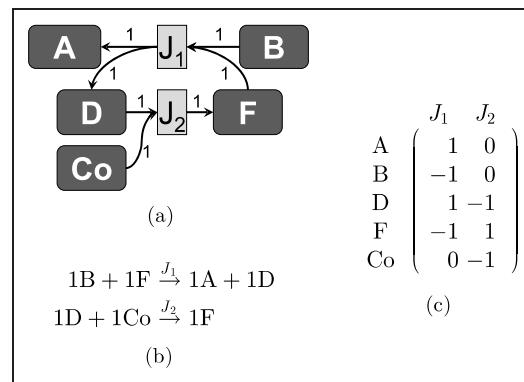


Bild 5: (a) kleines Beispielnetzwerk, (b) zugehörige Reaktionsgleichungen, (c) zugehörige stöchiometrische Matrix.

ein Beispielnetzwerk gezeigt wird. Ein gutes Beispiel zur Modellierung mit anschließender Flussanalyse findet sich auch in [11]. Zur Modellierung des *E. coli*-Stoffwechsels wird das metabolische Netzwerk iAF1260 [12] herangezogen, welches eine Rekonstruktion des *E. coli*-Metabolismus aus Genomdaten (1260 Open Reading Frames) und Literaturdaten darstellt. Zur Anpassung des Modells an unsere Problemstellung werden die spezifischen Mutationen der pyruvat-auxotrophen Ausgangsmutante implementiert.

Die verschiedenen Metabolite des Netzwerkes werden dafür in interne Metabolite C_0 mit den Konzentrationen $c_0 \in \mathbb{R}^{n_0}$ und externe Metabolite C_e mit den Konzentrationen $c_e \in \mathbb{R}^{n_e}$ unterschieden. Die stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionsgleichungen werden für interne Metabolite in einer stöchiometrischen Matrix $N_{(0)} \in \mathbb{R}^{n_0 \times m}$ erfasst, siehe Bild 5(c), ebenso für externe Metabolite in $N_{(e)} \in \mathbb{R}^{n_e \times m}$. Mit den im Vektor $J \in \mathbb{R}^m$ gesammelten Reaktionsraten erhält man folgende Beziehungen zwischen den Änderungen der Konzentrationen und den stöchiometrischen Matrizen:

$$N_{(0)} J = \dot{c}_0 \quad N_{(e)} J = \dot{c}_e. \quad (13)$$

Der Verbrauch und die Produktion externer Metabolite kann auf diese Weise einfach bilanziert werden.

Zudem können manche Reaktionen nur in eine Richtung ablaufen. Diese irreversiblen Flüsse werden durch zusätzliche Beschränkungen erfasst:

$$J_i \geq 0, \text{ für einige } i. \quad (14)$$

Das Modell iAF1260 liefert mit den vorhergehenden Gleichungen eine Beschreibung des metabolischen Netzwerkes einer *E. coli*-Zelle. Mit den für die pyruvat-auxotrophe Mutante implementierten Modifikationen enthält das Modell 1668 Metabolite und 2118 Reaktionen. Im Folgenden wird dieses Modell im Chemostat eingesetzt.

2.3 Metabolisches Netzwerk im Chemostat

Da die Populationsdynamik gegenüber den chemischen Reaktionen im Stoffwechsel langsam abläuft, stellt sich unter

den Bedingungen im Chemostat ein quasi-stationärer Zustand im Stoffwechsel der Mikroorganismen ein. In Abschnitt 2.1.1 wurde bereits die Beziehung zwischen Wachstumsrate und Verdünnungsrate, $\mu = D$ im stationären Fall des Reaktors, sofern $\hat{\mu} > D$, besprochen. Im stöchiometrischen Netzwerkmodell ist nun die Reaktion J_μ die Wachstumsreaktion und diese ist gleichbedeutend der Wachstumsrate μ im dynamischen Chemostatmodell. Somit folgt:

$$J_\mu = D. \quad (15)$$

Aus den nahezu konstanten Wachstumsbedingungen lässt sich die Annahme der Quasistationarität der zellinternen Metabolite für Gl. (13) rechtfertigen [13]:

$$N_{(0)} \mathbf{J} = 0. \quad (16)$$

Externe Stoffe dagegen werden produziert und konsumiert und können ebenfalls durch Gl. (13) bilanziert werden. Da die Transportreaktionen von externen zu internen Stoffen Teil des Flussvektors \mathbf{J} sind, kann man durch deren Beschränkung die Zusammensetzung des Mediums angeben. Ist z. B. Glukose im Medium nicht verfügbar, wird der Aufnahmefluss beschränkt:

$$J_{\text{Glukoseaufnahme}} \leq 0. \quad (17)$$

Dagegen ist eine Beschränkung von verfügbaren Mediumskomponenten wie Glycerin nicht notwendig, solange keine maximale Transportleistung beschrieben werden soll.

Während des Experiments werden verschiedene Mutationen zur Verbesserung der Güte bezüglich des Laktats führen. Für die *E. coli*-Ausgangsmutante besteht bei der besprochenen Prozessführung (Abschnitt 2.1.3) grundsätzlich die Möglichkeit, durch Mutationen Stück für Stück alternative Wege vom Glycerin zum Pyruvat zu aktivieren. Da dann Laktat nicht mehr essentiell für das Wachstum ist, ist somit der Ausbeutekoeffizient Y des Laktats unbeschränkt. Für die auf diese Weise entstandene pyruvat-prototrophe Population wird am Ende eines Experiments Glycerin das limitierende Substrat sein. Da dann der evolutionäre Druck in Richtung Verbesserung der Glycerinausbeute wirkt, wird im nächsten Abschnitt die Optimierung des Glycerinverbrauchs pro Biomasse bestimmt sein.

3 Flussbilanzanalyse

Das Hauptinteresse liegt hierbei in der Arbeitsweise des stöchiometrischen Netzwerkes im erreichten pyruvat-prototropen Endpunkt der Evolution im Bioreaktor.

Zur Optimierung der Glycerinausbeute kann mit Gl. (14), (15), (16) und den Restriktionen für die Mediumszusammensetzung ein Simplex aufgespannt werden, und zusammen mit einer geeigneten Zielfunktion erhält man ein lineares Optimierungsproblem (Bild 6).

Eine Untersuchung der Eignung von Zielfunktionen bei ähnlichen Problemstellungen findet sich in [14]. In unserem Fall ist die Maximierung der Ausbeute Y das Ziel,

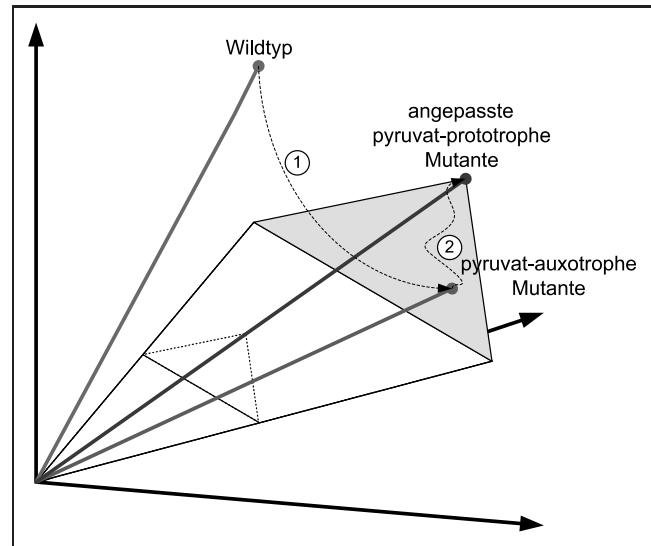


Bild 6: Durch die Restriktionen aufgespannter Simplex. (1) Der Wildtyp wird verändert (zusätzliche Mutationen drücken sich in Restriktionen aus) und die Ausgangsmutante ist pyruvat-auxotroph. (2) Während der Fermentation entwickelt sich die Ausgangsmutante bis zur Pyruvat-Prototrophie und hin zur optimalen Ausbeute des limitierenden Substrates.

weshalb auch Gl. (1c) zur Ableitung der Zielfunktion ZF herangezogen wird:

$$ZF = Y = \frac{J_\mu}{J_{\text{Glycerinaufnahme}}} \rightarrow \max \quad (18)$$

Für die Minimierung der Gütfunktion im Chemostat (Gl. (5)) ist zwar prinzipiell auch die Verringerung des $k_{m,i}$ oder die Vergrößerung des $J_{max,i}$ möglich, jedoch wird die Prozessführung (Abschnitt 2.1.3) zur Ausbeutemaximierung angepasst, um diese ungewollten Veränderungen weitgehend zu vermeiden.

Das Errechnen einer optimalen Flussverteilung \mathbf{J}_{opt} im Gleichgewichtszustand (Gl. (16)) bei gegebenen Restriktionen nennt sich Flussbilanzanalyse und ist seit mehr als 20 Jahren gängige Praxis [15; 16]. Ziel ist die Bestimmung, welche Stoffwechselwege im quasi-stationären Zustand unter den gegebenen Restriktionen aktiv sind. Die Quasi-Stationaritätsannahme lässt dabei die Formulierung als lineares Optimierungsproblem zu, wodurch auch die Lösung sehr großer Modelle möglich wird.

$$\begin{aligned} ZF &= \frac{J_\mu}{J_{\text{Glycerinaufnahme}}} \rightarrow \max \\ N\mathbf{J} &= 0 \\ J_\mu &= D \\ J_{\text{nicht verfügbare Substrate}} &\leq 0 \\ J_i &\geq 0, \quad \text{für einige } i \end{aligned} \quad (19)$$

Aufgrund der Existenz von gleichwertigen Stoffwechselwegen ist die Lösung des Optimierungsproblems nicht immer eindeutig. Gleichzeitig sind wir nicht nur an einer einzigen optimalen Lösung interessiert, sondern an allen potentiell möglichen Flussverteilungen, die alternative Wege vom Glycerin zum Pyruvat beschreiben. Die Analyse des konvexen Lösungskegels adressiert diese Problemstellung. Doch

Algorithmen wie Elementarmodenanalyse [17] oder Extremepathways [18] sind wegen ihrer kombinatorischen Komplexität ungeeignet für die Größe unseres stöchiometrischen Modells.

Um alle im Rahmen des Modells möglichen Stoffwechselwege zum Pyruvat zu ermitteln, wird das Optimierungsproblem mehrfach gelöst und dabei schrittweise modifiziert. Es wird der folgende Algorithmus angewendet:

1. Sofern das Optimierungsproblem Gl. (19) zulässig ist und die letzte Reaktion mit dem höchsten Pyruvatumsatz zum ersten Mal aufgetreten ist, finde eine Lösung.
2. Durchsuche die Lösung nach der Reaktion mit der höchsten Pyruvatproduktionsrate und erweitere das Optimierungsproblem folgendermaßen:

$$ZF = ZF - J_{\text{größter Pyruvatumsatz}}$$

$$0 \leq J_{\text{größter Pyruvatumsatz}}$$

Beginne anschließend bei 1.

Die spezielle Behandlung der Reaktionen mit dem höchsten Pyruvatumsatz dient hier zur Charakterisierung der Lösungsmenge. Ein Verbot einer Reaktion per Restriktion in den nachfolgenden Optimierungsproblemen ist ungeeignet, da dies bei einer essentiellen Reaktion zur Unzulässigkeit des Optimierungsproblems führt. Bestraft man die Reaktionen in der Zielfunktion, wird diese durch umgekehrtes Ablauen der Reaktion unbeschränkt. Deshalb wird die Umkehr der Reaktion durch eine zusätzliche Restriktion verboten.

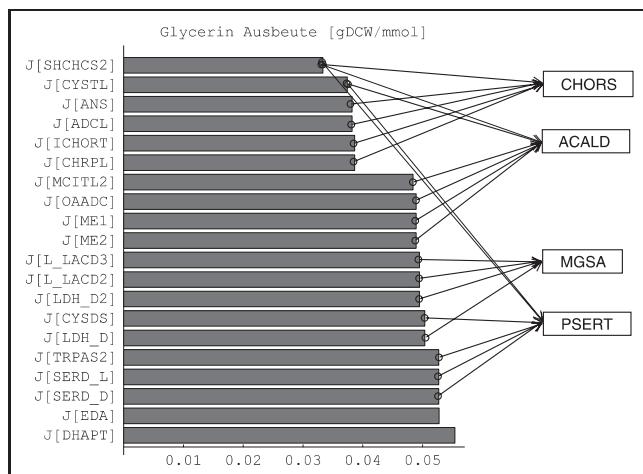


Bild 7: Verschiedene Flussverteilungen der Optimierung benannt nach der Reaktion mit dem höchsten Pyruvatumsatz und geordnet nach Glycerinausbeute in Gramm Trockenmasse pro mmol. Die Einteilung der Flussverteilungen in Gruppen folgt aus Abschnitt 4. Die Gruppe PSERT erzeugt zunächst Serin und verschiedene Reaktionen führen dann zum Pyruvat. Die Gruppe MGSA benutzt den Methylglyoxylatweg. Die Gruppe ACALD nutzt einen alternativen Weg zur Acetyl-CoenzymA-Produktion, der über Guanin als Überträgersubstanz für das Kohlenstoffgerüst funktioniert. Die Gruppe CHORS erzeugt zunächst Chorismat, das über verschiedenste Wege abgebaut wird, wobei auch Abbauprodukte anfallen. Die Flussverteilungen CYSTL und SHCHCS2 aktivieren Kombinationen dieser Gruppenreaktionswege. DHAPT und EDA stellen einzelne separate Wege dar.

Die nacheinander auftretenden optimalen Flussverteilungen sind zwar eindeutig bezüglich ihrer Reaktion zum Pyruvat, über die Eindeutigkeit der Reaktionsschritte vor dem Pyruvat wird aber keine Aussage getroffen. Wie auch zum Pyruvat, hat das große Stoffwechselnetzwerk häufig Alternativwege, die nicht unbedingt den Zielfunktionswert beeinflussen und so zu diesen Mehrdeutigkeiten führen können. Daher wird hier eine optimale Flussverteilung als Vertreter für eine Gruppe möglicher Flussverteilungen, die über eine bestimmte Reaktion zum Pyruvat führen, betrachtet.

Mit dem stöchiometrischen Modell iAF1260 wurden auf diese Weise 20 mögliche Flussverteilungen gefunden, die in Bild 7 noch in Gruppen eingeteilt sind. Eine einzelne Flussverteilung setzt sich aus einem Vektor mit 2118 Einträgen zusammen und ist in dieser Form schwer zu durchdringen. Die folgende Herausforderung besteht demzufolge darin, aus diesem Vektor die jeweilige Arbeitsweise des Stoffwechsels abzuleiten und damit auch die in Bild 7 dargestellte Gruppeneinteilung zu ermöglichen. Dies soll in Abschnitt 4 durch eine Visualisierung erreicht werden.

4 Analyse der Flussverteilungen

Ein schnelles Verständnis der jeweiligen Hauptcharakteristika einer Flussverteilung kann über eine Visualisierung erreicht werden. Da die automatisierte Darstellung in Form eines Netzwerkes aufwendig und sehr unübersichtlich ist, wird eine alternative Darstellungsform eingesetzt. Hierzu bietet die Frage nach der Quelle eines bestimmten Stoffes, in unserem Falle Pyruvat, einen Ansatz:

1. Welche Reaktionen produzieren einen Stoff (z. B. Pyruvat)?
2. Welche Stoffe sind die Edukte dieser Reaktionen?

Werden diese Fragen rekursiv beantwortet, bis man alle Quellen auf eine Komponente aus C_e zurückführen kann, erhält man eine Baumstruktur der Antworten (Bild 8). Die Visualisierung in Netzwerkform (Bild 8(a)) lässt sich so ohne Informationsverlust in die Baumform (Bild 8(b)) überführen. Bei Zyklen im stöchiometrischen Netz würde dies jedoch zu einer unendlichen Tiefe des Baumes führen. Aus diesem Grund wird eine Komponente nur einmal bis zu ihren externen Quellen verfolgt und ansonsten innerhalb des Baumes verlinkt. Dennoch sind die visualisierten Bäume eines sehr großen Netzwerkes recht komplex. Das Tool Freemind [19] erleichtert das Manövrieren im Baum, und zur Übersichtlichkeit können nicht interessierende Zweige verborgen werden. Jedoch ist eine weitere Vereinfachung wünschenswert. Da zum Verständnis des Stoffwechselweges nicht unbedingt die volle Detailinformation notwendig ist, werden Stoffe, die bis auf Kofaktoren äquivalent sind, zusammengefasst. Kofaktoren sind hier Stoffe wie zum Beispiel Wasserstoffatome (h), Wassermoleküle (H_2O), Phosphatgruppen oder Ammonium (NH_4). Die Übertragung solcher Kofaktoren bei einer Reaktion verändert nicht die Zahl der C-Atome und ist daher für

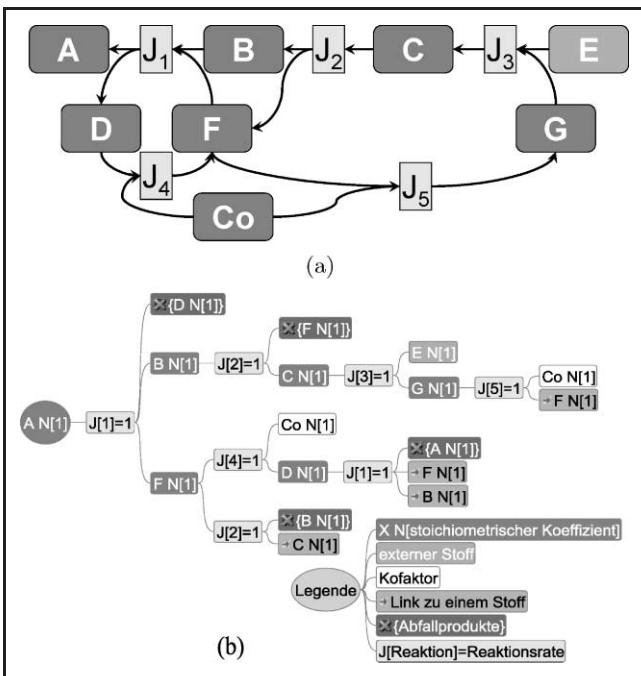
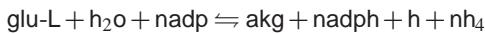


Bild 8: (a) Netzwerkdarstellung, (b) Darstellung im Baum.

die Generierung des C-Körpers von Pyruvat nicht relevant. Diese Reduktion kann rekursiv fortgesetzt werden. Z. B. bei der Reaktion Glutamatdehydrogenase:



kann, da NADP und NADPH ebenfalls bis auf den Kofaktor H äquivalent sind, auf diese Weise auch die Äquivalenz von glu-L und AKG bis auf Kofaktoren geschlussfolgert werden. Das folgende formale Vorgehen bringt eine wesentliche Vereinfachung der Darstellung.

Vorgehen:

- Lege eine Teilmenge von Kofaktoren Ko innerhalb der Menge von internen Metaboliten C_0 fest!

In unserem Fall sind die Kofaktoren so gewählt, dass sie keine Bausteine für das C-Skelett des Pyruvats liefern (H, H_2O, NH_4, Pi, \dots).

- Stoffe sind äquivalent bis auf Kofaktoren $X_i \xrightarrow{Ko} X_j$ und können in Pools zusammengefasst werden $P_{Ko, X_x} = \{X_i : X_i \xrightarrow{Ko} X_x\}$, wenn

– im Vektor J eine aktive Reaktion auftritt, die einen Stoff nur zusammen mit Kofaktoren in einen zweiten Stoff und Kofaktoren umwandelt

$$X_i + Ko \rightarrow X_j + Ko \Rightarrow \{X_i, X_j\},$$

– ein Stoff existiert, zu dem andere Stoffe bereits äquivalent sind

$$X_i \xrightarrow{Ko} X_x \wedge X_j \xrightarrow{Ko} X_x \Rightarrow \{X_i, X_j, X_x\},$$

– zwei aktive Reaktionen existieren und zwei äquivalente Stoffe bekannt sind, so dass

$$X_i + X_r \rightarrow X_m \rightarrow X_j + X_s \wedge X_r \xrightarrow{Ko} X_s \Rightarrow \{X_i, X_j\}.$$

Dieses Vorgehen resultiert in einer Zusammenfassung von Zeilen der stöchiometrischen Matrix, und so bewirkt eine mehrfache Anwendung auf das Netzwerk, dass immer mehr Komponenten in Pools zusammengefasst werden. Je öfter die Definition angewendet wird, desto niedriger wird der Detailgrad des Netzwerkes. Es werden dann nur noch echte Befüllungsreaktionen eines Pools angezeigt, was eine wesentliche Vereinfachung der Darstellung bedeutet. So wird in der Vereinfachung Bild 9 offensichtlich, dass der Stoffpool von A aus Stoff C gespeist wird.

Ziel der vereinfachten Darstellung ist das Verstehen der Stoffwechselwege vom Glycerin zum Pyruvat. Die hohe Konnektivität der wichtigen Metabolite, wie z. B. Pyruvat, behindert dabei die übersichtliche Darstellung in einem Netzwerk. Mit der reduzierten Baumdarstellung dagegen fällt es leichter, unwesentliche Informationen auszublenden. Die Reduktion des Detailgrades mittels des oben erläuterten Vorgehens ist aber unabhängig von der Visualisierung des Netzwerkes in einem Baum. Dennoch hat sich herausgestellt, dass der Umweg über ein Netzwerk in Baumform, dargestellt in verschiedenen Detailgraden, hin zu einem Stoffwechselweg, dargestellt in Netzwerkform wie in Bild 10, lohnend ist. Die Vorgehensweise entspricht einer Informationsextraktion, wobei die Relevanz einer Information einfach in der Baumdarstellung abzulesen ist.

Die Ähnlichkeit der 20 Flussverteilungen in ihren reduzierten Baumformen legt auch die Einteilung in Gruppen nahe. So wird der gemeinsame Stoffwechselweg von Glycerin zum Serin bei den vier gezeigten Flussverteilungen in Bild 10 einfach in der Baumform ersichtlich. Aus der endgültigen Darstellung der wesentlichen Information in Netzwerkform (Bild 10) lässt sich ableiten, welche Stoffe potentiell durch evolutive Adaptation einer pyruvatauxotrophen Mutante überproduziert werden können. Ein

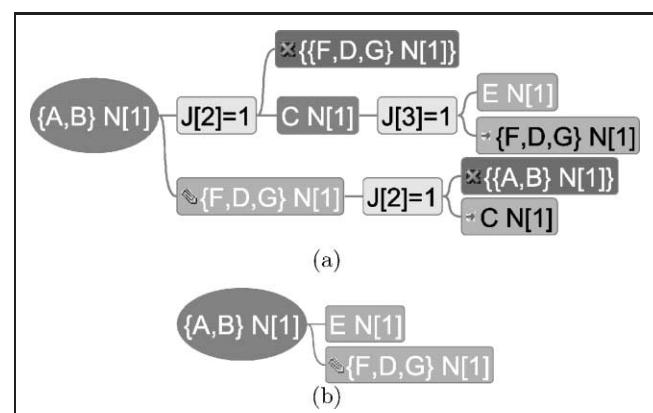


Bild 9: Symbole siehe Bild 8. Die Büroklammer markiert die Beteiligung eines Pools. So entsteht der Pool A,B unter Verwendung des Pools F, D, G, da wie in Bild 8(a) nur ein Kofaktor übertragen wird. (a) Baum nach zweifacher Anwendung des erläuterten Vorgehens. Hängt ein Pool an einem Pool, dann ist dieser Pool an der Bildung seines Vorfahren beteiligt. Nach der ersten Anwendung sind F, D und G in einem Pool. Daraus folgt, dass auch A und B in einem Pool sein müssen. (b) Aus dem Vorgehen 2. Punkt 3 folgt, dass B und E äquivalent sind. Da E ein externer Stoff ist, fallen B und E nicht in einem Pool zusammen, sondern E befüllt einfach den Pool von B.

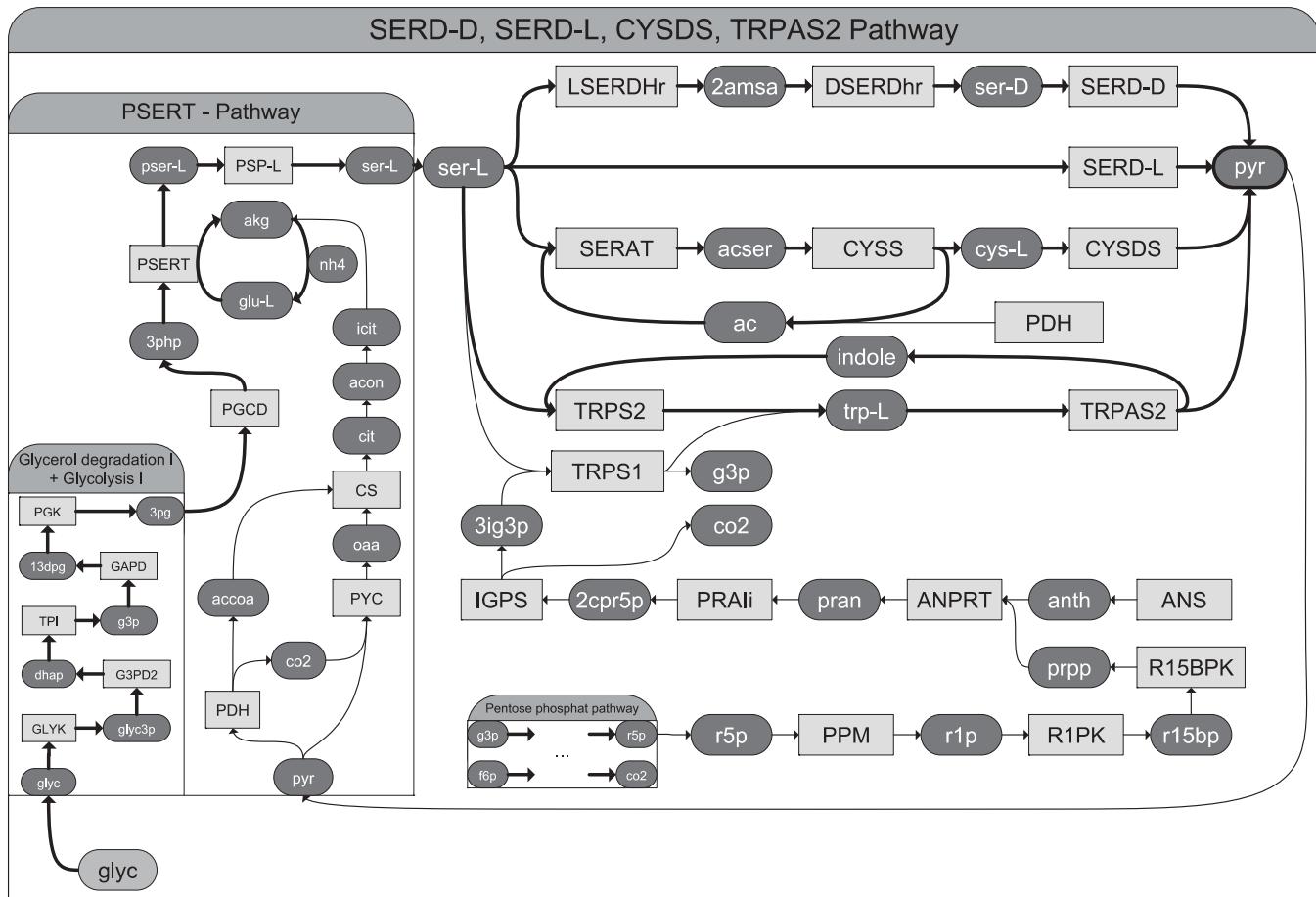


Bild 10: Diese Darstellung der PSERT-Gruppe aus Bild 7 vereinigt die relevante Information aus 4 verschiedenen Flussverteilungen (SERD-D, SERD-L, CYSDS, TRPAS2) mit jeweils 2118 Reaktionen. Die Flussverteilungen haben den Stoffwechselweg vom Glycerin (glyc) zum Serin (ser-L) gemeinsam. Vom Serin aus sind verschiedene Wege zum Pyruvat (pyr) aktiv. Die Stoffwechselwege sind autokatalytisch, da ein Teil des erzeugten Pyruvates zur Regenerierung von Überträgerpools, wie α -Ketoglutarat (akg) und Glutamat (glu-L), benötigt wird.

entsprechender Stamm mit dieser Flussverteilung kann als Grundlage für einen späteren Produktionsstamm dienen. Besonders Stämme, die alternative Flussverteilungen über den Aromaten Chorismat umgesetzt haben, sind für den industriellen Einsatz interessant.

5 Diskussion und Ausblick

Unser Ansatz ist, durch Mutation des Wildstammes von *E. coli* die Möglichkeit zur Ausübung eines gerichteten evolutionären Drucks im Chemostat zu schaffen. In unserem Fall wird ein pyruvat-auxotropher Ausgangsstamm zur Aktivierung alternativer Stoffwechselwege zum Pyruvat animiert. Die durch dieses Vorgehen erhaltenen pyruvat-prototrophen Stämme sollen als Vorläufer für Produktionsstämme für Stoffe auf diesen alternativen Stoffwechselwegen dienen.

Dazu wurde im Artikel zunächst ein Modell für die evolutive Adaptation im Chemostat mit zwei unterschiedlichen Stämmen hergeleitet. Die konkurrierenden Stämme wurden im Wesentlichen durch zwei Parameter (k_m und Y) beschrieben, und die eingeführte evolutive Gütfunktion erlaubt, die Konkurrenzfähigkeit dieser Mutanten zu vergleichen und gleichzeitig die Richtung des evolutiven Druckes

zu bestimmen. Da für uns die Verbesserung der Ausbeute im Vordergrund stand, konnten folgende nützliche Ergebnisse für die Prozessführung gewonnen werden: So wird mit dem Zufluss von Laktat in den Reaktor, der so hoch wie möglich gewählt wird, die Biomasse im Fermenter derart eingestellt, dass weder die Limitation durch Sauerstoff noch durch ein zweites Substrat eine Rolle spielt. Die heuristischen Einstellregeln für die Verdünnungsrate D berücksichtigen sowohl die Robustheit der Prozessführung als auch die Maximierung der Evolutionsgeschwindigkeit.

Das Ergebnis der Experimente im Bioreaktor sind pyruvat-prototrophe *E. coli*-Mutanten. Die Modellierung des Stoffwechsels erlaubt nun Hypothesen, welche Stoffwechselwege vom Glycerin zum Pyruvat in diesen Mutanten aktiv sein können. Mittels Flussbilanzanalyse wurden 20 verschiedene Flussverteilungen gefunden. Die anschließende Untersuchung der Flussverteilung beschäftigt sich mehr mit der präsentablen Darstellung. Durch die Methode der reduzierten Visualisierung kann relativ einfach ein Überblick über die jeweilige Arbeitsweise des Stoffwechselweges zum Pyruvat gewonnen werden. So können auch die Möglichkeiten für den zukünftigen Einsatz als Produktionsstamm für Stoffe in diesen Flussverteilungen einfach abgeleitet werden.

Es wurden bereits pyruvat-prototrophe *E. coli*-Stämme im Bioreaktor erzeugt. In Zukunft jedoch sollen die *in silico* ermittelten Flussverteilungen im Bioreaktor reproduziert werden. Zudem müssen Maßnahmen ergreifen werden, um Flussverteilungen von Mutanten mit geringerer Glycerinausbeute im Bioreaktor zu etablieren. Denn viele Stoffwechselwege, wie z. B. über das Chorismat, haben zwar im Vergleich eine verminderte Glycerinausbeute, aber dafür interessante Stoffe für die industrielle Produktion auf ihrem Reaktionspfad.

Danksagung

Wir danken dem Center of Systems Biology der Universität Stuttgart für die Finanzierung und das interdisziplinäre Dach unserer Forschung.

Literatur

- [1] GILLES, E. D.: Regelung – Schlüssel zum Verständnis biologischer Systeme. In: *Automatisierungstechnik* 50 (1/2002), S. 7–17.
- [2] LEIFHEIT, J.; HEINE, T.; KAWOHL, M.; KING, R.: Rechnergestützte halbautomatische Modellierung biotechnologischer Prozesse. In: *Automatisierungstechnik* 55 (5/2007), S. 211–218.
- [3] WIECHERT, W.: Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. In: *J Biotechnol* 94 (2002), Mar, Nr. 1, S. 37–63.
- [4] SAUER, U.: Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 73 (2001), S. 129–169.
- [5] FONG, S. S.; NANCHEN, A.; PALSSON, B. O.; SAUER, U.: Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Mar, Nr. 12, S. 8024–8033. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M510016200>. – DOI 10.1074/jbc.M510016200.
- [6] BABU, M. M.; ARAVIND, L.: Adaptive evolution by optimizing expression levels in different environments. In: *Trends Microbiol* 14 (2006), Jan, Nr. 1, S. 11–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2005.11.005>. – DOI 10.1016/j.tim.2005.11.005.
- [7] IBARRA, R. U.; EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O.: *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth. In: *Nature* 420 (2002), Nov, Nr. 6912, S. 186–189. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01149>. – DOI 10.1038/nature01149.
- [8] DEKEL, E.; ALON, U.: Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. In: *Nature* 436 (2005), Jul, Nr. 7050, S. 588–592. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03842>. – DOI 10.1038/nature03842.
- [9] SMITH, HAL L.; WALTMAN, P.: *The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition*. Cambridge University Press, 1995.
- [10] MONOD, J.: The Growth of Bacterial Cultures. In: *Annual Review of Microbiology* 3 (1949), S. 371–394.
- [11] GHESHLAGHI, R.; SCHÄFER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; DOUGLAS, P. L.: Metabolic flux analysis for optimizing the specific growth rate of recombinant *Aspergillus niger*. In: *Bioprocess Biosyst Eng* 30 (2007), Nov, Nr. 6, S. 397–418. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-007-0136-x>. – DOI 10.1007/s00449-007-0136-x.
- [12] FEIST, A. M.; HENRY, C. S.; REED, J. L.; KRUMMENACKER, M.; JOYCE, A. R.; KARP, P. D.; BROADBELT, L. J.; HATZIMANIKATIS, V.; PALSSON, B. O.: A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), S. 121. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100155>. – DOI 10.1038/msb4100155.
- [13] STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, J. N. A. A.; ARISTIDOU, A. A. A.: *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Academic Press Inc., 1998.
- [14] SCHUETZ, R.; KUEPFER, L.; SAUER, U.: Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. In: *Mol Syst Biol* 3 (2007), S. 119. <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100162>. – DOI 10.1038/msb4100162.
- [15] EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O.: Metabolic flux balance analysis and the *in silico* analysis of *Escherichia coli* K-12 gene deletions. In: *BMC Bioinformatics* 1 (2000), S. 1.
- [16] EDWARDS, J. S.; COVERT, M.; PALSSON, B. O.: Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. In: *Environ Microbiol* 4 (2002), Mar, Nr. 3, S. 133–140.
- [17] KLAMT, S.; GAGNEUR, J.; KAMP, A. VON: Algorithmic approaches for computing elementary modes in large biochemical reaction networks. In: *IEE Proc Syst Biol* 152 (2005), Dec, Nr. 4, S. 249–255.
- [18] PAPIN, J. A.; PRICE, N. D.; WIBACK, S. J.; FELL, D. A.; PALSSON, B. O.: Metabolic pathways in the post-genome era. In: *Trends Biochem Sci* 28 (2003), May, Nr. 5, S. 250–258.
- [19] FreeMind 0.8.0, Tools zum Erstellen von MindMaps. <http://freemind.sourceforge.net/wiki/index.php>.

Manuskripteingang: 27. November 2007.

Dipl.-Biomat. Ronny Feuer ist Promotionsstudent am Institut für Systemdynamik der Universität Stuttgart. Hauptarbeitsgebiete: Modellierung und Analyse biologischer Systeme.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart, Fax: +49-(0)711-685-66371, E-Mail: ronny.feuer@isys.uni-stuttgart.de

Dipl.-Ing. Michael Ederer ist Promotionsstudent am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg. Hauptarbeitsgebiete: Modellierung und Analyse biologischer Systeme.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart, Fax: +49-(0)711-685-66371, E-Mail: ederer@mpi.magdeburg.mpg.de

Prof. Dr.-Ing. Ernst Dieter Gilles ist Gründungsdirektor des Max-Planck-Instituts für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg. Er ist Emeritus am Institut für Systemdynamik, Fakultät Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik (Maschinenbau) der Universität Stuttgart. Hauptarbeitsgebiete: Modellbildung, Simulation und Analyse biologischer Prozesse, Integrierte Navigationssysteme.

Adresse: Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Sandtorstraße 1, 39106 Magdeburg

Prof. Dr. Georg A. Sprenger ist Leiter des Instituts für Mikrobiologie (IMB). Hauptarbeitsgebiete: Gewinnung von Feinchemikalien mit *Escherichia coli*, Einsatz von bakteriellen Enzymen für die Biokatalyse.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Mikrobiologie, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, E-Mail: g.sprenger@imb.uni-stuttgart.de

Prof. Dr.-Ing. Oliver Sawodny ist Direktor des Instituts für Systemdynamik (ISYS). Hauptarbeitsgebiete: Modellbildung, Identifikation dynamischer Systeme, Systemanalyse und Systemsynthese.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik, E-Mail: sawodny@isys.uni-stuttgart.de

Dr. Thomas Sauter ist Arbeitsgruppenleiter für Systembiologie am Institut für Systemdynamik (ISYS). Hauptarbeitsgebiete: Modellierung und Analyse biologischer Systeme.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik, E-Mail: sauter@isys.uni-stuttgart.de