

Zellfabriken 4.0

Automatisierte Wege der mikrobiellen Stammentwicklung

JULIA TENHAEF, LARS HALLE, MORITZ-FABIAN MÜLLER, NIKLAS TENHAEF, STEPHAN NOACK

IBG-1: BIOTECHNOLOGIE, INSTITUT FÜR BIO- UND GEOWISSENSCHAFTEN, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH

The successful transformation of the conventional, petroleum-based industry into a sustainable bioeconomy is largely dependent on the availability of suitable microbial production strains for the biobased production of valuable compounds from renewable raw materials. For rapid and targeted development of optimal production strains, automation approaches for (un)directed strain construction and improvement are needed.

DOI: 10.1007/s12268-022-1780-z
© Die Autoren 2022

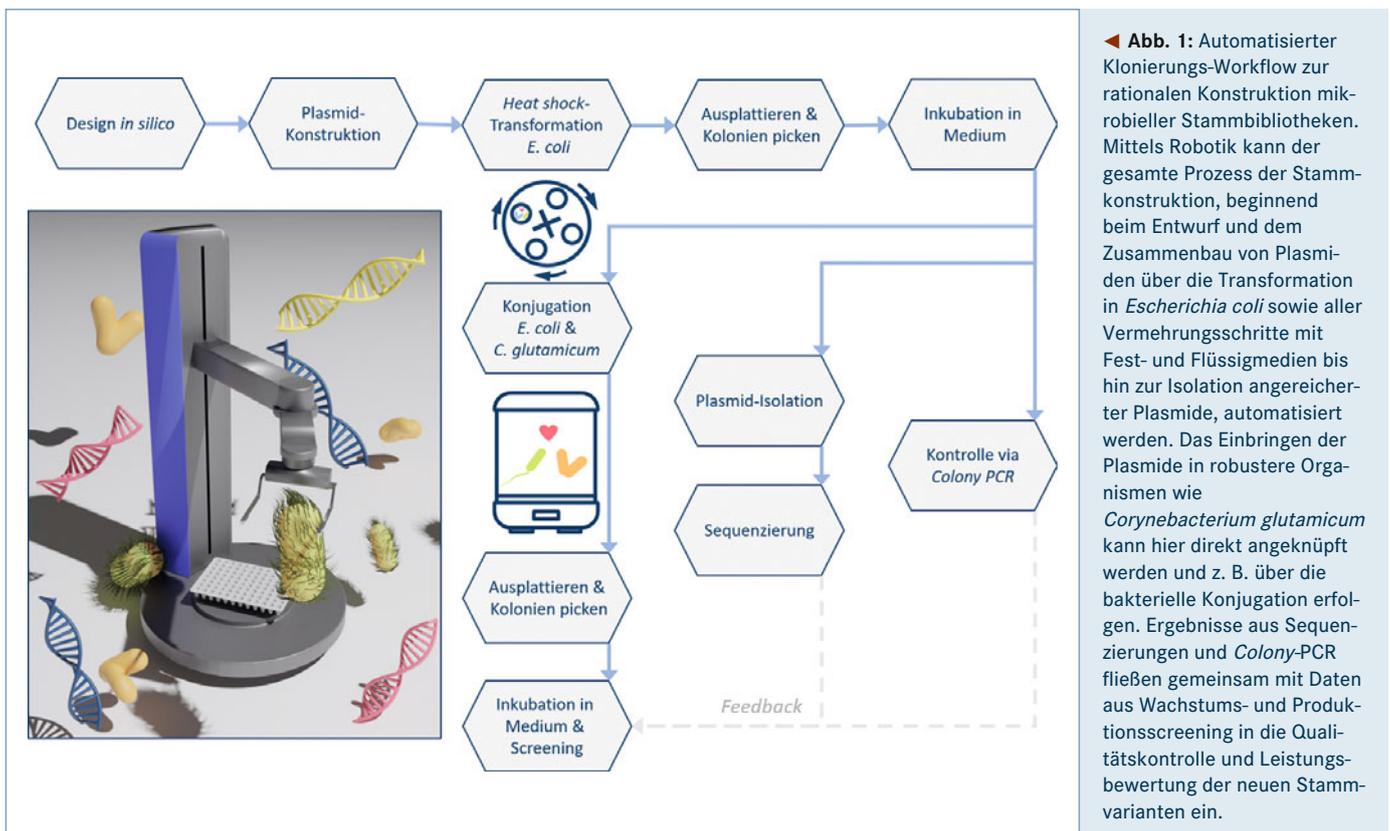
■ Auf dem Weg zu nachhaltigen und wirtschaftlichen Bioprozessen zur Produktion von Plattform- und Feinchemikalien ist die Erzeugung einer Vielzahl genetischer

Varianten eines ausgewählten mikrobiellen Produzenten unumgänglich. Das Ziel einer erhöhten Produktivität kann dabei auf unterschiedlichen Routen erreicht werden: Durch

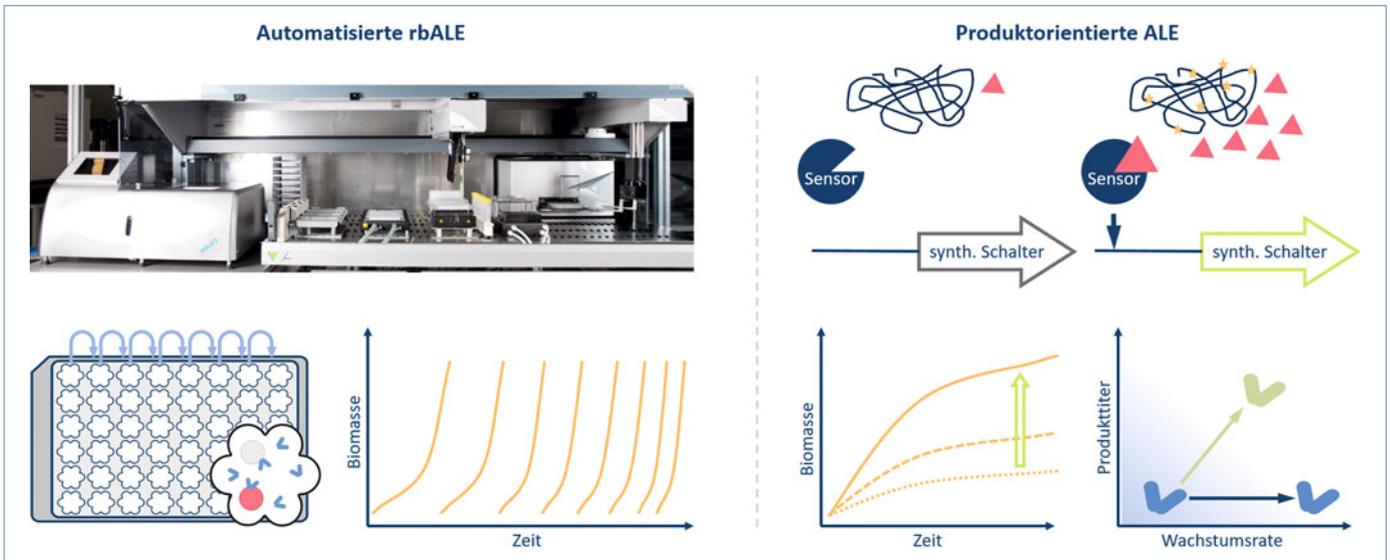
einen rationalen Ansatz, beispielsweise über eine zielgerichtete Veränderung von Biosynthesewegen, oder über einen evolutiven Ansatz mit geeignetem Selektionsdruck. Beide Wege haben großes Potenzial, bergen jedoch auch ganz eigene Hürden.

Eine Fülle möglicher Kombinationen für die gerichtete Stammkonstruktion

Bereits ein überschaubarer Biosyntheseweg mit nur fünf Genen und jeweils drei verschiedenen ribosomalen Bindestellen ergibt $3^5 = 243$ mögliche Stammvarianten. Wächst die Komplexität der Konstrukte, steigert sich die Anzahl der möglichen Kombinationen schnell exponentiell. Während mithilfe entsprechender Softwaretools ein computergestütztes, rationales Design solcher Genotypen (*in silico*-Klonieren) seit geraumer Zeit leicht möglich ist, bleibt die reale *in vitro*-Konstruktion der Stämme ein zeitintensiver,



◀ **Abb. 1:** Automatisierter Klonierungs-Workflow zur rationalen Konstruktion mikrobieller Stammbibliotheken. Mittels Robotik kann der gesamte Prozess der Stammkonstruktion, beginnend beim Entwurf und dem Zusammenbau von Plasmiden über die Transformation in *Escherichia coli* sowie aller Vermehrungsschritte mit Fest- und Flüssigmedien bis hin zur Isolation angereicherter Plasmide, automatisiert werden. Das Einbringen der Plasmide in robustere Organismen wie *Corynebacterium glutamicum* kann hier direkt angeknüpft werden und z. B. über die bakterielle Konjugation erfolgen. Ergebnisse aus Sequenzierungen und Colony-PCR fließen gemeinsam mit Daten aus Wachstums- und Produktionsscreening in die Qualitätskontrolle und Leistungsbewertung der neuen Stammvarianten ein.



▲ **Abb. 2:** Ansätze zur beschleunigten Verbesserung mikrobieller Stämme mittels adaptiver Laborevolution (ALE). Links: Automatisiertes repetitives Batchverfahren im Mikrotiterplattenformat. Hierbei wird ein Stamm unter Anlegung eines geeigneten Selektionsdrucks kultiviert, Wachstumsparameter online überwacht und nach Erreichen eines Biomasse-Schwellenwertes mittels Liquid Handler in einen neuen Batch überführt. So kann der Stamm innerhalb eines vergleichsweise kurzen experimentellen Zeitraums zu einem verbesserten Wachstum, z. B. auf neuen Substraten, evolviert werden. Rechts: Nutzung synthetischer Regelkreise zur „Umprogrammierung“ von Stämmen in Richtung einer produktorientierten ALE. Der Regelkreis nutzt einen spezifischen Biosensor, der in Abhängigkeit der Konzentration des Zielproduktes die Expression eines wachstumsregulierten Gens steuert. Hohe Zielproduktkonzentrationen führen hierbei zur De-regulation (d.h. Aktivierung) der Genexpression und damit zu einem beschleunigten Wachstum der Zellen. Somit ist eine zeitgleiche Verbesserung der Wachstums- und Produktionseigenschaften des ausgewählten Stammes möglich.

stark von manueller Arbeit geprägter und vor allem sich ständig wiederholender Workflow [1]. Hier sind daher dringend Automatisierungslösungen gefragt.

Die Automatisierung eines kompletten Klonierungsprozesses, d. h. von der Erzeugung der DNA-Bausteine bis zur Expression im Zielwirt, erfordert die Integration verschiedener molekularbiologischer Methoden, Geräte und Softwaremodule in einen funktionalen, technischen Workflow. Aufgrund dieser Komplexität sind Beispiele für solche Workflows immer noch rar, insbesondere für rationale Ansätze.

Darüber hinaus sind die meisten Zielorganismen genetisch schwer zugänglich und existierende automatisierte Workflows sind derzeit auf leicht handhabbare und bestens untersuchte Modellorganismen beschränkt, z. B. *Escherichia coli* [2] und *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Insbesondere *E. coli* ist jedoch aufgrund seiner geringen Stresstoleranz und Anfälligkeit gegenüber Phageninfektionen nicht immer ein idealer Wirt für industrielle Bioprozesse.

Daher haben wir mit der Entwicklung von automatisierten Klonierungsworkflows zur Anwendung auf ein breiteres Spektrum industriell genutzter Modellorganismen begonnen. Kürzlich ist es uns gelungen, einen ersten funktionalen Workflow zur wei-

testgehend automatisierten Erzeugung von Stammbibliotheken des biotechnologisch genutzten Plattformorganismus *Corynebacterium glutamicum* zu etablieren (**Abb. 1**, [4]). Das Gram-positive Bakterium *C. glutamicum* wird seit Jahrzehnten zur großtechnischen industriellen Produktion von Aminosäuren eingesetzt [5]. Zusätzlich dient es auch als Modellorganismus für verwandte humane Krankheitserreger, z. B. *Mycobacterium tuberculosis* [6].

Ein gemeinsames Merkmal von Corynebakterien und Mykobakterien ist das Vorhandensein einer komplexen, mehrschichtigen Zellwand. Daraus resultiert einerseits eine ungewünschte, effiziente Barriere für viele herkömmliche Antibiotika. Andererseits bedingt dies auch eine hohe Stresstoleranz der Zellen, welche insbesondere für den industriellen Einsatz von *C. glutamicum* vorteilhaft ist.

Für die gestellte Automatisierungsaufgabe bringt der komplexe Zellwandaufbau eine weitere Herausforderung mit sich, da hier für den entscheidenden Schritt, das Einbringen von Plasmid-DNA in die Zellen (vgl. Transformation in **Abb. 1**), einfache Standardverfahren wie ein Hitzeschock nicht funktionieren. Auch der für *C. glutamicum* etablierte Ansatz mittels Elektroporation ist bisher nicht direkt in einen automatisierbaren Workflow übertragbar.

Zur Lösung dieses Problems haben wir daher auf die bekannte Methode der bakteriellen Konjugation zurückgegriffen, welche sich durch eine hohe Transformationseffizienz auszeichnet, aber durch den Einsatz von Agarplatten und Filterpapieren als manuell sehr mühsam gilt.

Die Konjugation als Schlüsselmethode wurde zunächst in einem Zentrifugations-schritt technisch vereinfacht und mithilfe von *E. coli* als Donor-Organismus in ein standardisiertes Transformationsverfahren für *C. glutamicum* in den Gesamtworkflow integriert. Wichtig ist hierbei, dass diese Methode nicht auf *C. glutamicum* als Zielorganismus beschränkt ist, sondern prinzipiell für jeden Mikroorganismus verwendet werden kann, der für einen horizontalen Gentransfer durch Konjugation empfänglich ist [7].

Als ein erstes erfolgreiches Anwendungsbeispiel des neuen Workflows konnte die rationale Konstruktion, Expression und Charakterisierung einer Bibliothek verschiedener Varianten eines Transkriptionsfaktor-basierten Biosensors Lrp in *C. glutamicum* gezeigt werden [4]. Der eingesetzte Lrp-Biosensor wurde für den intrazellulären Nachweis verschiedener Aminosäure entwickelt, wie beispielsweise L-Methionin. Er koppelt die cytosolische Konzentration der Ziel-

amino-säure an die Expression eines Reportergens, welches ein Fluoreszenzprotein (eYFP) codiert. Der modulare Aufbau des Biosensor-Konstrukts erlaubt, dass diverse genetische Bausteine – wie Promotoren oder ribosomale Bindestellen – gezielt, sowohl einzeln als auch in Kombination, variiert und charakterisiert werden konnten.

So wurde, neben neuen grundlegenden Erkenntnissen über die Funktionsweise des Lrp-Biosensors, auch eine verbesserte Variante mit einem erweiterten dynamischen Messbereich gewonnen [4].

Auf der Grundlage des entwickelten automatisierten Workflows kann der Zeitaufwand des Experimentators für die Stammkonstruktion auf ein Minimum reduziert und infolge des hohen Parallelisierungsgrads die Menge an erzeugten Varianten pro Zeiteinheit drastisch erhöht werden. Zusätzlich führt die Automatisierung zwangsläufig zu einer Standardisierung einzelner molekularbiologischer Schritte, wodurch der Gesamtprozess leichter überwacht und analysiert werden kann. Damit können Fehler minimiert und Verbesserungsmöglichkeiten identifiziert werden, wodurch langfristig sowohl die Quantität als auch die Qualität der Klonierungsaufgaben erhöht wird.

Wege zur ungerichteten Verbesserung von Stämmen

Im Gegensatz zum rationalen Weg umgeht ein evolutiver Ansatz einige kombinatorische Einschränkungen der gerichteten Konstruktion von Biosynthesewegen und erleichtert so den Zugang zu weitaus komplexeren Stoffwechselwegen.

Die adaptive Laborevolution (ALE) ist eine einzigartige und leistungsstarke Technik in der Biotechnologie und basiert auf dem Prinzip der evolutionsbedingten Anpassung einer Zelle an sich ändernde Umweltbedingungen auf der Grundlage natürlicher Mutation und Selektion. Das Grundprinzip ist immer das gleiche: Mikroorganismen werden unter Anlegung eines Selektionsdrucks kultiviert und das Selektionskriterium „schnelleres Wachstum“ sorgt dafür, dass evolvierte Zellen sich in der Population durchsetzen und die weniger angepassten Zellen überwachen.

Es gibt bereits eine Vielzahl erfolgreicher Anwendungsbeispiele von ALE für biotechnologisch relevante Produktionsorganismen und unter Nutzung verschiedener technologischer Ansätze [8]. Die Kombination von

ALE-Experimenten mit Next Generation Sequencing und Omics-Technologien ermöglicht darüber hinaus ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen, die einem veränderten Genotyp bzw. Phänotyp zugrunde liegen.

Ein technisch einfacher Ansatz basiert auf sich wiederholenden Batch-Kulturen (repetitiver Batch-ALE, rbALE), der in kleinen Volumina wie Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt werden kann (**Abb. 2**). Dadurch ist es möglich, mehrere Bedingungen und/oder Stammvarianten parallel zu testen. Aufgrund der fortlaufend angelegten Überschussbedingungen ist der Selektionsdruck entlang der rbALE vergleichsweise hoch. Im Standardansatz ist dieses Verfahren aber aufgrund des manuellen Überimpfens im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Durchsatz eingeschränkt.

Zur Behebung dieser Limitationen arbeiten wir daher seit geraumer Zeit an verbesserten technologischen Ansätzen zur automatisierten und autonomen Durchführung von rbALE-Experimenten [9]. Auf Basis einer mikrobiellen Phänotypisierungs-Plattform (Mini Pilot Plant) mit Liquid-Handling-Roboter und integriertem MTP-basierten Mikrobioreaktorsystem [10] können vollautomatisierte rbALE-Experimente durchgeführt werden. Der weitestgehend autonome Workflow umfasst dabei die Vorbereitung verschiedener Medien, deren kühle Zwischenlagerung sowie die wiederholte Inokulation und Inkubation einzelner MTP-Kavitäten (**Abb. 2**).

Online-Messungen (Streulicht, pO_2 , pH und Fluoreszenz) gewährleisten, dass sich die Kulturen zum Zeitpunkt des Überimpfens genau in der gewünschten Wachstumsphase befinden. Die Performance der Zellen wird kontinuierlich überwacht und auftretende Mutationsereignisse während des rbALE-Experiments können direkt erfasst und später im Detail untersucht werden.

Mit dem klassischen rbALE-Ansatz kann jedoch ausschließlich auf verbessertes Wachstum des jeweiligen Produzenten selektiert werden. Es gibt abseits des Spektrums an natürlichen, wachstumsgekoppelten Produkten keine einfache Möglichkeit, Stämme in Richtung höherer Produktion eines Zielmoleküls zu evolvieren. Um diese Einschränkung zu überwinden und das Zellwachstum als Proxy für die Produktivität nutzen zu können, gibt es bereits eine Reihe vielversprechender Ansätze aus der synthetischen

Biologie und computergestützter Stoffwechselmodellierung [11].

Kürzlich haben wir eine neue ALE-Strategie vorgestellt, die auf der Integration eines synthetischen Regelkreises auf Basis des zuvor erwähnten Lrp-Biosensors beruht [12]. Durch die eingebrachte Kopplung von cytosolischer Aminosäurekonzentration an die Expression wachstumsregulierender Gene ist eine Selektion auf Produktion über das evolutionsbedingte Lösen der Wachstumsbremse möglich. Durch den Einsatz klassischer Agarplatten als Zwischenschritt in der Kultivierung können zudem „Schummler“-Stämme (*cheater*) erfolgreich in Schach gehalten werden. Die *cheater* umgehen den spezifischen Evolutionsdruck durch Inaktivierung des eingebrachten Regelkreises und können somit das Ergebnis verfälschen. Durch deren räumliche Abtrennung wurden schließlich neue Stämme mit verbesserter und stabiler Aminosäureproduktion in Flüssigkultur gewonnen.

Aufgrund der Fülle bekannter Biosensoren kann der entwickelte produktionsorientierte Evolutionsansatz für verschiedene Mikroorganismen angewandt werden und rbALE damit als praktikables Werkzeug zur schnelleren Verbesserung der Produktion vielfältiger Wertstoffe von industriellem Interesse dienen.

Ausblick

In der Zukunft werden wir den Automatisierungsgrad der vorgestellten Workflows zur (un)gerichteten Stammkonstruktion und -verbesserung weiter erhöhen. Einzelne Prozessschritte erfordern aktuell noch einen manuellen Eingriff und sind in Bezug auf den Durchsatz limitierend. Im Rahmen einer geplanten „Biofoundry Rheinisches Revier“ ist es unser Ziel, die entwickelten Workflows und das gewonnene Wissen sowohl der wissenschaftlichen Gemeinschaft als auch biotechnologischen Industriepartnern zugänglich zu machen. Auf diesem Weg können Entwicklung und Optimierung mikrobieller Produktionsprozesse weiter beschleunigt und grundlegende organismenspezifische Fragestellungen schneller und effizienter beantwortet werden.

Danksagung

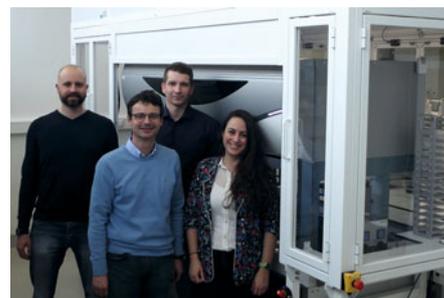
Wir danken dem BMBF für die Unterstützung im Rahmen der Förderung des Innovationslabors „AutoBiotech“ innerhalb des Projekts BioökonomieREVIER (www.biooekonomierevier.de/Innovationslabor_AutoBiotech). ■

Literatur

- [1] Appleton E, Madsen C, Roehner N, Densmore D (2017) Design automation in synthetic biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9: a023978
- [2] Carbonell P, Jervis AJ, Robinson CJ et al. (2018) An automated design-build-test-learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals. *Commun Biol* 1: 66
- [3] Si T, Chao R, Min Y et al. (2017) Automated multiplex genome-scale engineering in yeast. *Nat Commun* 8: 15187
- [4] Tenhaef N, Stella RG, Frunzke J, Noack S (2021) Automated rational strain construction based on high-throughput conjugation. *ACS Synth Biol* 10: 589–599
- [5] Baumgart M, Unthan S, Kloß R et al. (2018) *Corynebacterium glutamicum* chassis C1*: building and testing a novel platform host for synthetic biology and industrial biotechnology. *ACS Synth Biol* 7: 132–144
- [6] Borah K, Mendum TA, Hawkins ND et al. (2021) Metabolic fluxes for nutritional flexibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Syst Biol* 17: e10280
- [7] Brophy JA, Triassi AJ, Adams BL et al. (2018) Engineered integrative and conjugative elements for efficient and inducible DNA transfer to undomesticated bacteria. *Nat Microbiol* 3: 1043–1053
- [8] Stella RG, Wiechert J, Noack S, Frunzke J (2019) Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol J* 14: 1800444

- [9] Radek A, Tenhaef N, Müller MF et al. (2017) Miniaturized and automated adaptive laboratory evolution: evolving *Corynebacterium glutamicum* towards an improved D-xylose utilization. *Bioresour Technol* 245: 1377–1385
- [10] Unthan S, Radek A, Wiechert W et al. (2015) Bioprocess automation on a mini pilot plant enables fast quantitative microbial phenotyping. *Microb Cell Fact* 14: 32
- [11] Orsi E, Claassens NJ, Nickel PI, Lindner SN (2021) Growth-coupled selection of synthetic modules to accelerate cell factory development. *Nat Commun* 12: 5295
- [12] Stella RG, Gertzen CGW, Smits SHJ et al. (2021) Biosensor-based growth-coupling and spatial separation as an evolution strategy to improve small molecule production of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* 68: 162–173

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Moritz-Fabian Müller, Stephan Noack, Lars Halle und Julia Tenhaef (v. l. n. r.).

Korrespondenzadresse:

Dr.-Ing. Stephan Noack
 IBG-1: Biotechnologie
 Institut für Bio- und Geowissenschaften,
 Forschungszentrum Jülich GmbH
 Leo-Brandt-Straße
 D-52428 Jülich
 s.noack@fz-juelich.de
 www.fz-juelich.de

Hier steht eine Anzeige.

 Springer