

## Biosensoren

# Die Sensorik der Zelle für die Biotechnologie nutzen

JULIA FRUNZKE

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

### VAAM-Forschungspreis 2016

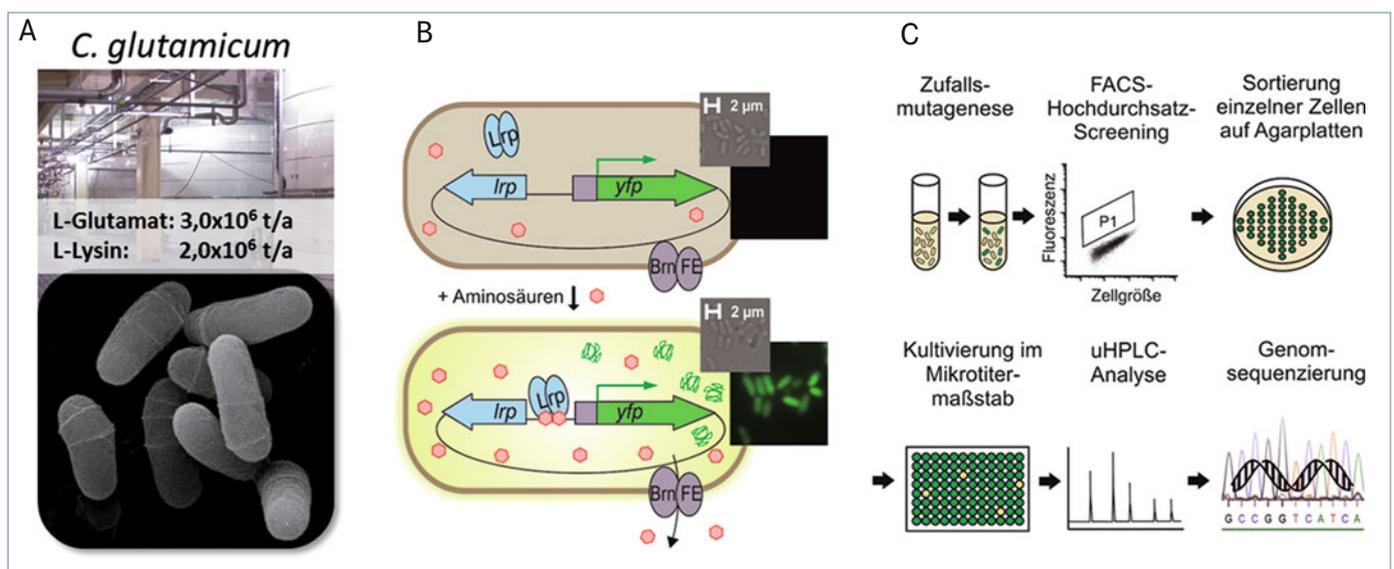
Nature has evolved a plethora of different sensor devices in form of proteins or RNAs. In recent studies, we have harnessed the sensory capability of bacterial transcription factors for the design of genetically encoded biosensors enabling the detection of a variety of different intra- or extracellular stimuli. These biosensors provide important insights into microbial population dynamics and can be implemented in high-throughput screening approaches accelerating biotechnological strain development.

DOI: 10.1007/s12268-016-0680-5

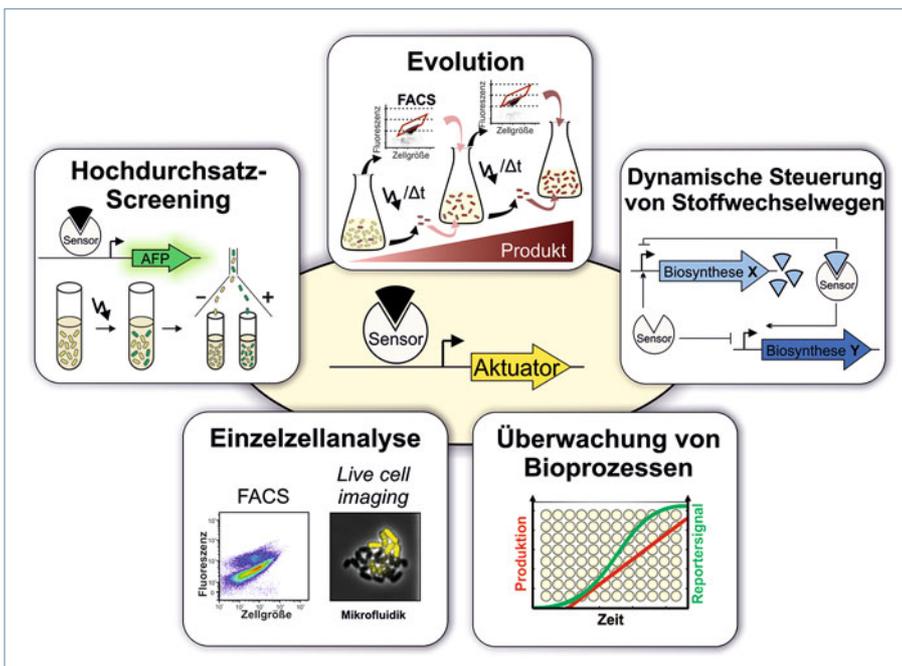
© Springer-Verlag 2016

■ Die phäno- und genotypische Diversifizierung mikrobieller Populationen bildet die Grundlage für deren optimale Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen und für die

Interaktion mit Freund und Feind. Viele Standardmethoden liefern jedoch ausschließlich Durchschnittsdaten für bestimmte Messgrößen und verschleiern somit die Dynamik, die auf der Ebene einzelner Zellen und Mikrokolonien stattfindet. Selbst genetisch identische mikrobielle Populationen können komplexe phänotypische Strukturen ausprägen, die das Überleben der Spezies unter sich verändernden Umweltbedingungen sichern oder Arbeitsteilung als Energiesparmaßnahme erlauben. Aber auch jenseits der natürlichen ökologischen Nischen ist die Erzeugung genetischer Diversität ein erster Schritt für die Selektion neuer mikrobieller Produktionsstämme mit verbesserten Eigenschaften zur Herstellung verschiedener Bioprodukte auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Für ein systemisches Verständnis mikrobieller Populationen sowie für die Etablierung effizienter Analyse- und Screeningverfahren in der Bio-



▲ **Abb. 1:** Entwicklung eines Aminosäure-Biosensors für *Corynebacterium glutamicum*. **A,** Das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum* ist einer der wichtigsten industriell genutzten Aminosäure-Produzenten. **B,** Auf Basis des Transkriptionsregulators Lrp wurde ein Biosensor entwickelt, der die intrazelluläre Akkumulation von Aminosäuren (verzweigt-kettige Aminosäuren oder L-Methionin) in ein Fluoreszenzsignal umwandelt; *eyfp*: Gen für *yellow fluorescent protein*; BrnFE: Aminosäure-Exporter. **C,** Dieser Biosensor findet z. B. Anwendung in FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-basierten Hochdurchsatz-Screenings zur Isolierung produktiver Klone nach Zufallsmutagenese. Mittels FACS werden hier Klone isoliert, welche nach Zufallsmutagenese ein erhöhtes Sensorsignal aufweisen. Im Folgenden werden isolierte Klone in Mikrotiterplatten kultiviert und die Ausbeute des gewünschten Produkts im Überstand gemessen (uHPLC). Die Genomsequenzierung ausgewählter Mutanten führt letztlich zur Identifizierung der produktionssteigernden Mutationen.



▲ **Abb. 2:** Einsatzbereiche von Transkriptionsfaktor-basierten Biosensoren in der Biotechnologie. Genetisch codierte Biosensoren, die auf den sensorischen Eigenschaften von Transkriptionsregulatoren beruhen, finden in der Biotechnologie Anwendung in der Überwachung von Bioprozessen, der Echtzeitanalyse mikrobieller Populationen auf Einzelzellebene, dem FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Hochdurchsatz-Screening sowie in evolutiven Ansätzen, die auf wiederholter FACS-Sortierung von Zellen mit erhöhtem Sensorsignal beruhen. Außerdem ermöglichen regulatorische Schaltkreise die dynamische Kontrolle synthetischer Stoffwechselwege. AFP: *autofluorescent protein*. Verändert nach [1].

technologie benötigen wir methodische Ansätze, die Einblicke in die phänotypische Dynamik einzelner Zellen liefern.

### Genetisch codierte Biosensoren

Die Natur hat im Zuge der Evolution eine Vielfalt sensorischer Mechanismen entwickelt, dank derer Zellen verschiedene Moleküle und Umweltbedingungen wahrnehmen und diese Informationen auf die Ebene der Genexpression weiterleiten können. Für die Entwicklung genetisch codierter Biosensoren dient diese natürliche Sensorik, in Form von Proteinen oder kleinen RNAs, als Vorbild [1, 2]. Integriert in synthetische Schaltkreise, ermöglichen diese Sensoren Einblicke in die phänotypische Dynamik einzelner bakterieller Zellen. Dass genetisch codierte Biosensoren auch für die biotechnologische Stammentwicklung von großem Nutzen sind, zeigen unsere Arbeiten zur Entwicklung eines Aminosäure-Biosensors auf Basis des Transkriptionsregulators Lrp (*leucine-responsive protein*) in *Corynebacterium glutamicum* [3]. Dieses Gram-positive Bakterium ist einer der wichtigsten industriell genutzten Stämme und wird jährlich zur Produktion von mehr als fünf Millionen Tonnen Aminosäuren einge-

setzt. Der Lrp-Biosensor detektiert die intrazelluläre Akkumulation der Aminosäuren L-Methionin, L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin und übersetzt diese durch eine Fusion von *eyfp* (*enhanced yellow fluorescent protein*) an den Zielpromotor von Lrp (*brnFE*) in ein Fluoreszenzsignal (**Abb. 1**, [3]). Mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie ist es dann möglich, die Produktivität einzelner bakterieller Zellen sichtbar zu machen. Einsatz fand dieser Sensor beispielsweise im online-Monitoring der L-Valin-Produktion von Pyruvatdehydrogenase-defizienten Stämmen (*C. glutamicum ΔaceE*) im Bioreaktor sowie in mikrofluidischen Chip-Systemen. Die zeitlich aufgelöste Fluoreszenzmikroskopie von Sensorzellen offenbarte hier das Auftreten unproduktiver Subpopulationen in der L-Valin-Produktionsphase verschiedener *ΔaceE*-basierter Stämme [4]. Des Weiteren konnten wir auf Basis dieses Sensors ein FACS-basiertes (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung) Hochdurchsatz-Screening entwickeln, um produktive Klone nach Zufallsmutagenese zu isolieren [3]. Dass der Einsatz genetisch codierter Biosensoren für die Einzelzellanalyse und Screeningverfahren für verschiedene Metaboliten anwendbar ist, verdeutlicht die stetig

steigende Anzahl vergleichbarer Studien der letzten Jahre (**Abb. 2**, [1]).

### Biosensorgestützte Evolution

Zufallsmutagenese in Kombination mit auf Biosensoren basierten Screeningverfahren ermöglicht, im Gegensatz zu rationalen Ansätzen, die Identifizierung nicht-intuitiver Mutationen, die einen positiven Einfluss auf die Produktion interessanter Metaboliten haben. Dennoch zeigen unsere Erfahrungen und die anderer Gruppen, dass die Vielzahl der genomischen Veränderungen nach Zufallsmutagenese (zum Teil über 300 *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) die Identifizierung der jeweiligen produktionssteigernden Mutationen erschwert. Aus diesem Grund haben wir kürzlich einen evolutiven Ansatz entwickelt, der auf der natürlichen Mutageneserate der Zellen beruht und bei dem das Signal des Biosensors als artifizierender Selektionsdruck fungiert [5]. Zellen mit erhöhtem Sensorsignal wurden wiederholt mit FACS isoliert und rekultiviert. Bereits nach fünf Runden konnte somit eine deutliche Steigerung (etwa 25 Prozent) der L-Valin-Produktion von *C. glutamicum ΔaceE* erreicht werden. Einige isolierte Klone zeigen eine Steigerung des L-Valin-Titers um 100 Prozent, ein deutlich verbessertes Wachstum und eine verringerte Nebenproduktbildung (L-Alanin). Die Genomsequenzierung ausgewählter Stämme offenbarte gerade einmal sieben SNPs [5]. Durch Analyse ausgewählter Mutationen im Ursprungsstamm konnte bei einzelnen Mutationen (*loss of function* in *ureD*) eine erhöhte L-Valin-Produktion, eine verringerte Nebenproduktbildung (Mutation im globalen Regulator GlxR) und eine gesteigerte Wachstumsrate (Mutation im ribosomalen Protein) beobachtet werden. Diese Ergebnisse sowie die Daten anderer Gruppen verdeutlichen das Potenzial von Biosensoren für den Einsatz in adaptiven Evolutionsexperimenten zur Optimierung biotechnologischer Produktionsstämme (**Abb. 2**, [1]).

### Spontane Prophageninduktion

Neben dem *Metabolic Engineering* eignen sich genetisch codierte Biosensoren für die Beobachtung und Analyse der phänotypischen Heterogenität bakterieller Populationen. Ein besonderes Augenmerk widmen wir hier einem seit beinahe 100 Jahren beschriebenen Phänomen lysogener Bakterienstämme: der spontanen Prophageninduktion [6]. Sie lässt sich mit aktueller Technik und mithilfe von geeigneten Biosensoren live und in Farbe

beobachten. In der Tat zeigt die rasch ansteigende Anzahl sequenzierter bakterieller Genome, dass fast jeder Stamm genomisch integrierte Prophagenelemente enthält. Immer wieder tauchen in der Literatur Beispiele auf, dass diese Elemente und deren spontane Aktivierung einen positiven Einfluss auf die Fitness des jeweiligen Wirts haben, indem sie beispielsweise die Stress-toleranz erhöhen, die Bildung von Biofilmen unterstützen oder die Virulenz pathogener Stämme steigern [7]. Dennoch ist über die molekularen Ursachen, die zur spontanen Induktion der Prophagen in Abwesenheit eines externen Auslösers führen, bislang nur wenig bekannt. Das Genom des industriell genutzten Stamms *C. glutamicum* ATCC 13032 weist insgesamt drei Prophagenelemente auf (CGP1–3). Der größte dieser Prophagen, CGP3, der mehr als sechs Prozent des Genoms ausmacht, wird spontan unter Standardbedingungen induziert [8]. Abhängig von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen tritt diese spontane Aktivierung in 0,1 bis fünf Prozent der Wildtypzellen auf [8, 9]. Die fluo-

reszenzmikroskopische Echtzeitanalyse von Reporterstämmen zeigt eine signifikante Korrelation des Auftretens spontaner DNA-Schäden, die zur Aktivierung der SOS-Antwort führen, und der Induktion des Prophagen in einzelnen Zellen (**Abb. 3**, [10]). In einer nennenswerten Fraktion (über 30 Prozent) von Zellen findet die Induktion jedoch SOS-unabhängig statt. Es ist das Ziel aktueller Arbeiten, weitere Mechanismen zu identifizieren, die es Zellen ermöglichen, im Rahmen der ständigen Interaktion zwischen Phage und Wirt die Rate der spontanen Prophageninduktion zu manipulieren und den jeweiligen Erfordernissen anzupassen.

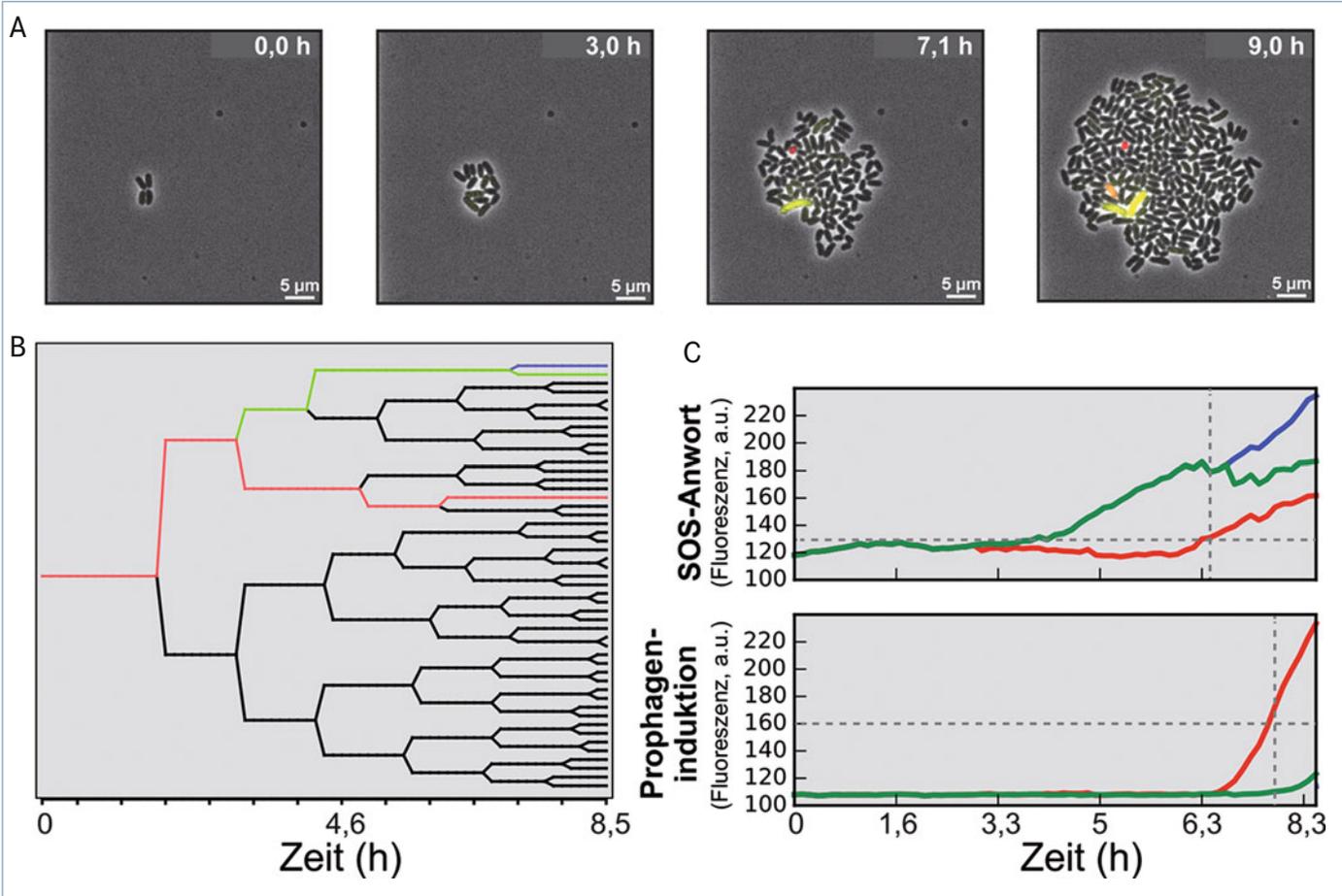
### Entwicklung neuer Biosensoren

Viele aktuelle Arbeiten verdeutlichen das Potenzial genetisch codierter Biosensoren für die biotechnologische Stammentwicklung und die Einzelzellanalyse mikrobieller Populationen und Gemeinschaften. Für eine breite Anwendbarkeit von synthetischen Regelkreisen bedarf es effizienter Strategien zur gezielten Entwicklung von Sensoren mit

geeigneten Charakteristika. Die Vision der Synthetischen Biologie ist die Konstruktion neuer Regelkreise auf Basis standardisierter und transferierbarer (orthogonaler) Bausteine. Dennoch gleicht die Entwicklung neuer synthetischer Sensorkonstrukte nur selten dem Baukastenprinzip. Die Funktionalität gewählter Bausteine ist häufig stark mit dem jeweiligen biologischen System verknüpft, und eine optimale Orthogonalität ist selten. In diesem Zusammenhang ist die Kombination von rationalen Verfahren der Synthetischen Biologie mit effizienten Screenings sowie evolutiven Ansätzen vielversprechend, um eine möglichst hohe Funktionalität neuartiger Schaltkreise zu erzielen.

### Danksagung

Ich danke allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihr Engagement und ihre Begeisterung und meinem Doktorvater Michael Bott für die kontinuierliche Unterstützung und Bereitstellung idealer Rahmenbedingungen zur Vereinbarkeit von Familie und Karriere. Jenseits der Arbeit danke ich meinem Mann



▲ **Abb. 3:** Spontane Induktion von Prophagen in isogenen bakteriellen Populationen. Das Auftreten spontaner Prophageninduktion ist ein bekanntes Phänomen lysogener Bakterienkulturen. Die quantitative Auswertung von Reporterstudien zeigt eine signifikante Korrelation zwischen der Aktivierung der SOS-Antwort (DNA-Schäden,  $P_{recA}$ , gelbe Fluoreszenz) und der Induktion von Prophagenelementen (rote Fluoreszenz) in *Corynebacterium glutamicum*. **A,** Wachstum einer ausgewählten Mikrokolonie im mikrofluidischen Chip-System [11]. **B,** Auswertung in Form eines Stammbaums. **C,** zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzsignals von drei ausgewählten Zellen. Verändert nach [10].

und meiner Familie für ihre ausdauernde und liebevolle Unterstützung. Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Helmholtz-Gemeinschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). ■

## Literatur

- [1] Mahr R, Frunzke J (2016) Transcription factor-based biosensors in biotechnology: current state and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:79–90
- [2] van der Meer JR, Belkin S (2010) Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8:511–522
- [3] Mustafi N, Grünberger A, Kohlhöyer D et al. (2012) The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metab Eng* 14:449–457
- [4] Mustafi N, Grünberger A, Mahr R et al. (2014) Application of a genetically encoded biosensor for live cell imaging of L-valine production in pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains. *PLoS One* 9:e85731
- [5] Mahr R, Gätgens C, Gätgens J et al. (2015) Biosensor-driven adaptive evolution of L-valine production of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* 32:184–194
- [6] Lwoff A (1953) Lysogeny. *Bacteriol Rev* 17:269–332
- [7] Nanda AM, Thormann KM, Frunzke J (2015) Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial

- populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol* 197:410–419
- [8] Frunzke J, Bramkamp M, Schweitzer JE et al. (2008) Population heterogeneity in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 caused by prophage CGP3. *J Bacteriol* 190:5111–5119
  - [9] Nanda AM, Heyer A, Krämer C et al. (2014) Analysis of SOS-induced spontaneous prophage induction in *Corynebacterium glutamicum* at the single-cell level. *J Bacteriol* 196:180–188
  - [10] Helfrich S, Pfeifer E, Krämer C et al. (2015) Live cell imaging of SOS and prophage dynamics in isogenic bacterial populations. *Mol Microbiol* 98:636–650
  - [11] Grünberger A, Probst C, Helfrich S et al. (2015) Spatiotemporal microbial single-cell analysis using a high-throughput microfluidics cultivation platform. *Cytometry A* 87:1101–1115

## Korrespondenzadresse:

Juniorprof. Dr. Julia Frunzke  
 Institut für Bio- und Geowissenschaften  
 IBG 1: Biotechnologie  
 Forschungszentrum Jülich  
 D-52425 Jülich  
 Tel.: 02461-61-5430  
 Fax: 02461-61-2710  
 j.frunzke@fz-juelich.de

## AUTORIN



### Julia Frunzke

Jahrgang 1980. 1999–2004 Biologiestudium an der Universität Marburg. 2004–2007 Doktorarbeit am Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie. 2008–2009 Postdoc an der ETH Zürich, Schweiz. Seit 2009 Gruppenleiterin am Institut für Bio- und Geowissenschaften am Forschungszentrum Jülich. Dort seit 2011 Leiterin einer Helmholtz-Nachwuchsgruppe. Seit 2013 Juniorprofessorin an der Universität Düsseldorf.