Synthetische Biologie

Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als universelle chemische Mikrofabrik

JUTTA HEIM, THOMAS ØSTERGAARD TANGE, JENS KLEIN
EVOLVA S/A, REINACH, SCHWEIZ

One of the applications of the emerging synthetic biology field is the enzymatic production of chemicals, either by individual enzymes or by cascades of whole metabolic pathways. Here, the discovery of novel metabolites from baker's yeast transformed with yeast artificial chromosomes is described. One particular class of compounds found repeatedly are structurally diverse novel polyketides obtained by expression of mixes of PKSIII (polyketide synthase type III).

DOI: 10.1007/s12268-014-0462-x
© Springer-Verlag 2014

Synthetische Biologie in Bäckerhefe

■ Synthetische Biologie wird vielfach als neue, sich rasant entwickelnde Ingenieurwissenschaft bezeichnet, die im Wesentlichen auf der Gentechnologie und den biologisch-chemischen Informatikwissenschaften aufbaut. Eines der großen Ziele der Synthetischen Biologie ist die Produktion neuer Biomoleküle durch baukastenartiges Zusammen-

fügen einzelner enzymatischer Funktionen, die in ihrer Zusammenwirkung zu neuen Verbindungen führen sollen. Dabei sollen explizit taxonomische Grenzen der Spenderorganismen überschritten und neue Biosynthesewege generiert werden, die als solche nicht in der Natur vorkommen [1]. Die durch den Menschen seit Jahrtausenden zur Nahrungs- und Genussmittelproduktion eingesetzte Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bietet sich un-

mittelbar als Wirtsorganismus für diesen neuen Ansatz der Synthetischen Biologie an. Das Hefegenom ist bestens bekannt. Hefe ist genetischen Manipulationen gut zugänglich, und als Eukaryot entsprechen viele Proteine in ihrer Funktionalität denjenigen höherer Organismen. Zudem kann Hefe große DNA-Fragmente in Form von künstlichen Chromosomen aufnehmen, die es ermöglichen, gleichzeitig eine große Anzahl neuen genetischen Materials in Hefe einzuschleusen. Hefe wächst robust auf einfachen Nährmedien, was die großtechnische Fermentation und Herstellung größerer Mengen niedermolekularer Zielmoleküle vereinfacht (**Abb. 1**). Der Transfer eines (nahezu) kompletten Biosyntheseweges und die Produktion einer Vorstufe des pflanzlichen Malariamittels Artemisinin in Hefe sind kürzlich beschrieben worden [2]. Die Isolierung bislang unbekannter, strukturell neuer Verbindungen ist dagegen ein vollständig neues Gebiet.

Künstliche Hefe-Chromosomen

Die in den 1980er-Jahren vor allem für das Sequenzieren großer DNA-Fragmente entwickelten künstlichen Hefe-Chromosomen werden durch uns in ihrer einzigartigen Kapazität genutzt, sowohl komplexe Genbanken aufzunehmen wie auch längere vorgeformte Biosynthesewege in einem einzigen Transformationsschritt in Hefe einzubringen. Die Fremdgene werden zunächst in Eingangsvektoren (konventionellen bakteriellen Plasmiden) unter Kontrolle eines Sets

◀ **Abb. 1:** Arbeitsschritte zur Herstellung von Hefetransformatanten, die neue Metaboliten sekretieren. Genbanken unterschiedlichster Herkunft werden zunächst in bakterielle Eingangsvektoren kloniert, die entstehenden Expressionskassetten ausgeschnitten und als Mischungen gemeinsam mit Chromosomen-Armen zu künstlichen Chromosomen ligiert, die anschliessend in Bäckerhefe transformiert werden. Im letzten Schritt wird der Überstand der transformierten Hefestämme mittels chromatographischer und spektroskopischer Verfahren auf neue Verbindungen überprüft.

von Hefe-Promotoren wie auch -Terminatoren gebracht. Danach schneidet man die resultierenden Expressionskassetten mit selten schneidenden Restriktionsenzymen aus und ligiert die Expressionskassettenmischungen anschließend zu langen DNA-Molekülen. In einem letzten Schritt werden die Arme der künstlichen Chromosomen anligiert. Die Arme enthalten zusätzlich zum Replikationsursprung, dem Centromer und den Telomer-Enden auch noch Selektionsmarker, mit deren Hilfe das Wachstum erfolgreich transformierter auxotropher Hefezellen detektiert wird. Um der potenziellen Instabilität der künstlichen Chromosomen durch Rekombination entgegenzuwirken, verwenden wir in den Eingangsvektoren mehrere Promotoren (und Terminatoren), die allerdings in gleicher Weise reguliert werden. Ein bevorzugtes Promotorenset sind die Promotoren der Methioninbiosynthese, die sequenziell unterschiedlich, aber in gleicher Weise durch Entzug von Methionin induziert werden. Southern Blots der Transformanten zeigen, dass die künstlichen Chromosomen minimal 50 Kilobasen groß sind und Größen bis zu 600 Kilobasen erreichen können [3]. Unter Beachtung der bereits beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen sind sie sehr stabil, und es werden über 100 Millionen Transformanten, die mehrheitlich aufgrund der zufallsgetriebenen Kassettenligation unterschiedliche Genkombinationen tragen, erzielt. Im Fall der Expression von bekannten Biosynthesewegen nutzen wir die Kapazität der künstlichen Chromosomen dazu, Dutzende homologer Enzyme aus verschiedenen Organismen zu integrieren. Um vorgeformte Biosynthesewege oder gesonderte, komplexe Enzymreaktionen mit cDNA-Banken interessanter Spenderorganismen zu kombinieren, transformieren wir in der Regel Biosyntheseenzyme in Hefen des Paarungstyps α und Genbanken in haploide a -Zellen. Die anschließende Paarung der kompletten Transformantenpopulationen führt zu diploiden Zellen mit je zwei künstlichen Chromosomen und zu verdoppelter Synthesekapazität.

Produktion, Reinigung und Strukturauflösung der neuen Metaboliten

Im Gegensatz zu potenten Sekundärmetabolitproduzenten, wie z. B. Streptomyzeten, verfügt die Hefe über einen sehr begrenzten eigenen Sekundärmetabolismus. Nach der Fermentation kann daher der Überstand direkt oder nach einer Ein-Schritt-Fraktio-

► **Abb. 2:** Chromatogramme von Ethylacetat-Extrakten von Hefe-Überständen.

A, Totalionenchromatogramm (TIC) des Überstands einer transformierten Hefe. **B**, TIC einer Fraktion (präparative HPLC) eines Kontrollhefestamms (ohne künstliche Chromosomen). Die HPLC-Fraktion des Kontrollhefestamms entspricht der Fraktion in C. **C**, TIC einer HPLC-Fraktion des Ethylacetat-Extrakts in A. Die HPLC-Fraktion zeigte Wirkung in einem sekundären Aktivitätstest. **D**, TIC der isolierten, im Aktivitätstest wirksamen Verbindung der HPLC-Fraktion in C.

nierung auf neu gebildete und ausgeschiedene Metaboliten mittels *ultra-performance liquid chromatography*/Massenspektrometrie (UPLC/MS) analysiert werden. Alternativ kann ein Hochdurchsatzscreening in die Hefe eingebaut werden, das Transformanten mit biologisch aktiven Metaboliten selektioniert [4]. **Abbildung 2** zeigt ein typisches Totalionenchromatogramm eines Hefeextrakts, einer aktiven HPLC-Fraktion und der aufgereinigten neuen Verbindung im Vergleich zur identischen Fraktion eines nicht-transformierten Ausgangsstamms. Alle Strukturen wurden auf der Basis von ein- und zweidimensionalen Kernspinresonanz(NMR)-Spektren aufgeklärt.

Chemoinformatische Analyse

Der Vergleich von ca. 80 auf diese Art erhaltenen Verbindungen mit Strukturdatenbanken ergab eine Neuheit von über 75 Prozent. 20 Prozent der Grundstrukturen wurden bisher nicht beschrieben. Die von uns gefundenen neuen, durch Synthetische Biologie erzeugten Verbindungen besitzen komplexere Strukturen als Bestandteile herkömmlicher Screening-Archive. In dieser Eigenschaft sind sie, trotz ihres kleinen durchschnittlichen Molekulargewichtes von ca. 300 Dalton, klassischen Naturstoffen ähnlich. 90 Prozent der Verbindungen entsprechen Lipinskis empirisch gefundener „Fünfer-Regel“, die eine Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit

einer Verbindung erlaubt. Alle Substanzen weisen funktionelle Gruppen für chemische Modifikationen auf und eignen sich daher

sehr gut als optimierbare Leitstrukturen (für eine detaillierte chemoinformatische Analyse siehe [4]).

Neue Polyketide des PKS-III-Typs

Gemische von 34 Polyketid-Synthase-Typ-III- (PKS III)-Genen (**Tab. 1**) auf dem ersten künst-

Tab. 1: Polyketid-Synthase-Typ-III-Gene (PKS-III-Gene), als Gemische auf künstlichen Hefe-Chromosomen. Die Gene wurden teilweise in bevorzugtem Hefe-Codongebrauch synthetisiert. Gen-Nummern aus der Datebank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Enzym	Quelle	Gen-Nr.
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	<i>Petroselinum crispum</i>	Y07654
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	X51513
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	<i>Zea mays</i>	L77912
Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	<i>Aspergillus niger</i>	XM_001401766
4-Cumarat-CoA-Ligase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	BX649606
4-Cumarat-CoA-Ligase	<i>Nicotiana tabacum</i>	U50845
4-Cumarat-CoA-Ligase	<i>Petroselinum crispum</i>	X13325
4-Cumarat-CoA-Ligase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	AL939119
Cinnamat-4-Hydroxylase	<i>Petroselinum crispum</i>	L38898
Cinnamat-4-Hydroxylase	<i>Amni majus</i>	AY219918
Cinnamat-4-Hydroxylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U71081
Pinosylvin-Synthase	<i>Pinus densiflora</i>	AB030140
Pinosylvin-Synthase	<i>Pinus sylvestris</i>	S50350
Stilben-Synthase	<i>Arachis hypogaea</i>	AB027606
Stilben-Synthase	<i>Vitis vinifera</i>	S63227
Resveratrol-Synthase	<i>Arachis hypogaea</i>	X62299
Resveratrol-Synthase	<i>Rheum tataricum</i>	AF508150
Stilben-Synthase	<i>Pinus strobus</i>	Z46914
Cumaryl-Triessigsäure-Synthase	<i>Hydrangea macrophylla</i>	AB011468
Stilbencarboxylat-Synthase	<i>Hydrangea macrophylla</i>	AF456446
Curcuminoid-Synthase	<i>Oryza sativa</i>	AK109558
Octaketid-Synthase	<i>Aloe arborescens</i>	AY567707
2'-Oxoalkylresorcylicsäure-Synthase	<i>Neurospora crassa</i>	XM_955334
Trihydroxybenzol-Synthase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	U41818
Typ-III-Polyketid-Synthase-RppA	<i>Streptomyces antibioticus</i>	AB084489
Biphenyl-Synthase	<i>Sorbus aucuparia</i>	DQ286036
Benzophenon-Synthase	<i>Hypericum androsaemum</i>	AF352395
Acridon-Synthase	<i>Ruta graveolens</i>	Z34088
4-Cumaryl-4'-hydroxyphenylmilchsäure-3-Hydroxylase	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	AB017418
Hydroxyphenylpyruvat-Reduktase	<i>Solenostemon scutellarioides</i>	AJ507733
Hydroxyphenylpyruvat-Reduktase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BX818677
Malonyl-CoA-Synthetase	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	AF117694.1
NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase CPR 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	D13788
Cytochrom-P450-Reduktase ATR 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_118585.3

► **Abb. 3:** Neue Polyketide des PKS-III-Typs. Hefestämme wurden mit einem Gemisch von 34 Polyketid-Synthasen-Typ-III-Genen (Tab. 1) auf künstlichen Chromosomen transformiert. Die Hefen enthielten zusätzlich noch künstliche Chromosomen mit verschiedenen cDNA-Bibliotheken (GC-125, GC-126, GC-153, GC-304, GC-336, GC-337: *Cerium rubrum*; GC-196: *Brachionis plicatilis*; GC-281, GC-344: *Curvularia inaequalis*; GC-331, GC-332: *Azadirachta indica*).

lichen Chromosom wurden mit verschiedenen cDNA-Bibliotheken auf einem zweiten künstlichen Chromosom kombiniert. Das erlaubte die Isolierung vieler neuer Verbindungen mit Polyketid-Grundgerüst. PKS III eignen sich speziell für unseren auf Diversität ausgerichteten Ansatz. Sie synthetisieren Polyketide durch wiederholte decarboxylative Claisen-Kondensation von Malonyl-CoA-Einheiten. Die Superfamilie ist außerdem in der Lage, die linearen Moleküle zu Endprodukten zu tautomerisieren, zyklisieren und aromatisieren [5, 6]. Wir konnten vorwiegend Ketide des Triketidpyron-Typs isolieren (**Abb. 3**), aber auch Tetraketidpyrone (z. B. GC-332). Um das verantwortliche PKS-III-Gen zu identifizieren und gezielt ein ausgewähltes Polyketid in größeren Mengen herzustellen, müssten in einem nächsten Schritt auf konventionelle Weise alle PKS-III-Gene individuell überexprimiert werden. In unseren bisherigen Arbeiten haben sich die neuen Verbindungen jedoch als innovative Strukturlieferanten herausgestellt, deren anschließende chemische Synthese oftmals keine Probleme bereitete. Einmal nachsynthetisiert, eignen sich die so gefundenen Strukturen sehr gut für eine weiter gehende chemische Optimierung. Damit reiht sich unser durch die Synthetische Biologie getriebener Ansatz nahtlos in die vorhandene chemische Infrastruktur von Unternehmen mit Interesse an neuen optimierten Leitstrukturen zur anschließenden großtechnischen Herstellung ein.

Ausblick

Die enzymatische Herstellung neuer chemischer Verbindungen mithilfe Synthetischer Biologie ist ein Gebiet, das noch in seinen Anfängen steckt, aber bereits jetzt erstaunliche Resultate zeigt. Die von uns zum ersten Mal aus Hefe isolierten Strukturen sind überwiegend neu, divers und haben ansprechende physikochemische Eigenschaften für eine nachfolgende Optimierung zu Leitstrukturen. Das Hinzufügen weiterer Proteinfamilien, wie z. B. NRPS (nicht-ribosomale Peptid-Synthasen) oder PKS-Typ-I und -Typ-II, oder optimierter cDNA-Banken sollte die Diversität neu aufgefundener Strukturen weiter verbreitern und damit insgesamt die Attraktivität der Synthetischen Biologie als Chemielieferant signifikant erhöhen.

Danksagung

Die vorgestellten Arbeiten wurden zum Teil durch Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz finanziert. Unser Dank gilt allen Wissenschaftlern der Evolva-Forschungsabteilung für ihren großen Einsatz. ■

Literatur

- [1] Mitchell W (2011) Natural products from synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol* 15:505–515
- [2] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR et al. (2012) Production of amoradiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E111–E118
- [3] Naesby M, Nielsen SV, Nielsen CA et al. (2009) Yeast artificial chromosomes employed for random assembly of biosynthetic pathways and production of diverse compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 8:45

- [4] Klein J, Heal JR, Hamilton WD et al. (2014) Yeast synthetic biology platform generates novel chemical structures as scaffolds for drug discovery. *ACS Synth Biol* 3:314–323
- [5] Li J, Luo Y, Lee J-K et al. (2011) Cloning and characterization of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger*. *Bioorg Med Chem Lett* 21:6085–6089
- [6] Stewart C Jr, Vickery CR, Burkart MD et al. (2013) Confluence of structural and chemical biology: plant polyketide synthases as biocatalysts for a bio-based future. *Curr Opin Plant Biol* 16:365–372

Jutta Heim, Thomas Østergaard Tange und Jens Klein (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jutta Heim
Evolva S/A
Duggingerstraße 23
CH-4153 Reinach
Tel.: +41-(0)795934337
juttah@evolva.com