

Synthetische Biologie

Stoffwechsel 2.0: Retrosynthese des mikrobiellen Metabolismus

TOBIAS J. ERB

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRICHE MIKROBIOLOGIE UND ZENTRUM FÜR SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE (SYNMIKRO), MARBURG

VAAM-Forschungspreis 2017

Synthetic biology is a fast growing field with big promise for biotechnological applications. In our laboratory, we aim at realizing synthetic metabolism in a truly *de novo* approach via metabolic retrosynthesis. This includes the discovery and engineering of novel enzymes to sustain our designer pathways, the *in vitro* reconstitution and optimization of the synthetic routes, as well as the transplantation of these artificial pathways into living organisms.

DOI: 10.1007/s12268-017-0792-6
© Springer-Verlag 2017

Die Synthetische Biologie ist ein rasch wachsendes Forschungsfeld an der Schnittstelle von Mikro- und Molekularbiologie, Chemie, Ingenieurwissenschaften und Nano-

technologie. Ziel der Synthetischen Biologie ist es, biologische Systeme mit Eigenschaften zu erzeugen, die in der Natur nicht vorkommen. Während die klassische Biologie sich

bisher vor allem mit dem Aufklären und Verstehen der Lebensvorgänge in Zellen beschäftigte, steht die zeitgenössische Forschung vor der Herausforderung, dieses gesammelte Wissen nun anzuwenden, um Lebewesen mit neuen Fähigkeiten auszustatten. Der Biologe wird zum Designer einzelner Moleküle, Zellen und Organismen [1].

Noch liegt der Schwerpunkt hauptsächlich auf der Grundlagenforschung, aber die Erwartungen sind hoch, dass die Synthetische Biologie in Zukunft neue Produkte und Produktionsprozesse für die Medizin, Biotechnologie und Chemie hervorbringt. Mögliche Anwendungsgebiete der Synthetischen Biologie sind vielfältig und reichen von Biosensoren, die Schadstoffe oder Krankheiten erkennen und neutralisieren, über lebende Computer, also Zellen, die in der Lage sind, Rechnungen auszuführen und Informationen zu speichern, bis hin zu molekularen Zellfabriken, die neue Medikamente, Chemika-

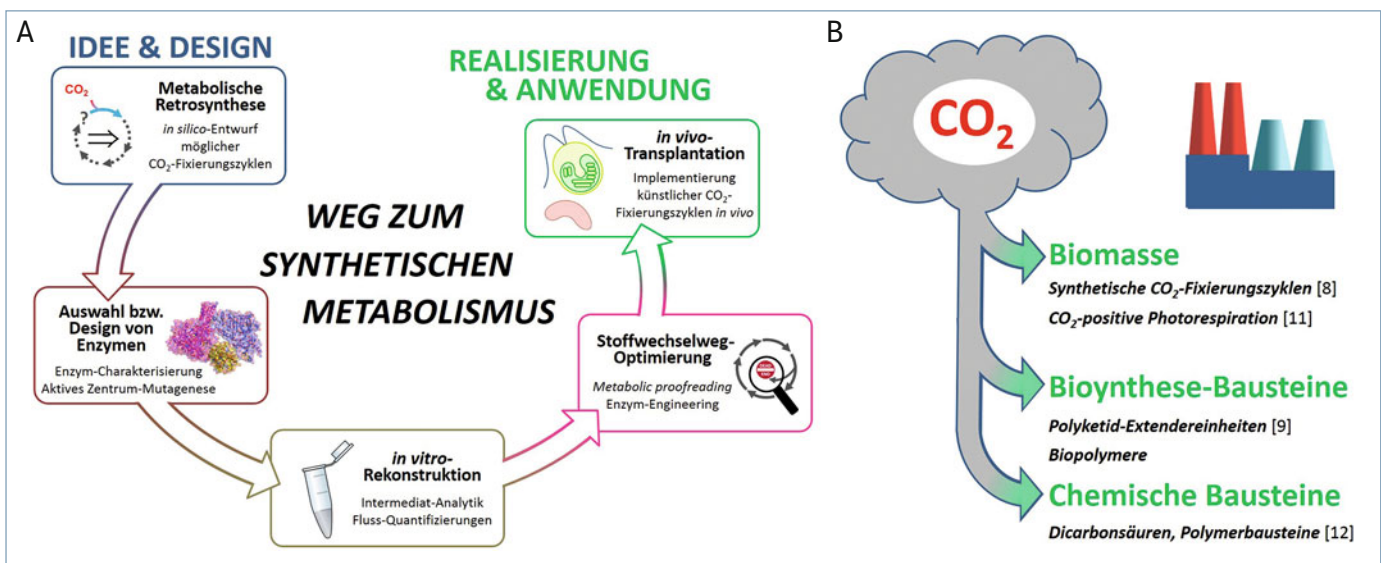


Abb. 1: Künstliche Stoffwechselwege: vom Design zur Anwendung. **A**, Strategie zur Realisierung künstlicher Stoffwechselwege (am Beispiel künstlicher CO₂-Fixierung). Am Anfang steht das Design künstlicher, effizienter Stoffwechselwege, basierend auf thermodynamischen Überlegungen und unter Einbezug aller denkbaren biochemischen Reaktionen. Die benötigten Enzyme werden in Enzymdatenbanken, durch Enzymscreening oder Enzymdesign etabliert. Die komplette Reaktionssequenz wird aus den einzelnen Enzymen im Reagenzglas konstituiert und anschließend durch Austausch einzelner Enzyme oder das Hinzufügen von Korrekturschleifen (*metabolic proofreading*) optimiert. Im Anschluss erfolgt die Transplantation der Reaktionssequenz in den lebenden Organismus. **B**, mögliche Anwendungen künstlicher Stoffwechselwege zur Gewinnung von atmosphärischem CO₂ als nachhaltige Kohlenstoffquelle der Zukunft. Die Literatur zu Pilotstudien und Konzepten ist angegeben.

lien oder auch Biokraftstoffe nachhaltig aus einfachen Rohstoffen, wie z. B. Kohlenstoffdioxid (CO₂), herstellen.

Inspiration aus der Natur: neue Stoffwechselwege in Mikroorganismen

In unserem Labor versuchen wir, mithilfe der Synthetischen Biologie neue, effiziente Stoffwechselwege zur CO₂-Fixierung zu kreieren [2]. Bei diesen Ansätzen handelt es sich nicht um klassisches metabolisches *Engineering*, bei dem einzelne Komponenten existierender Stoffwechselwege ausgetauscht oder optimiert werden. Unsere Versuche zielen darauf ab, künstliche Routen zu realisieren, die so nicht in der Biologie vorkommen bzw. entdeckt wurden [3].

Die Motivation für unsere Arbeiten entnehmen wir der Natur selbst. Genomsequenzierungsprojekte und neue mikrobielle Isolate deckten in den letzten Jahren mehrere bisher völlig unbekannte Stoffwechselwege im Zentralstoffwechsel von Mikroorganismen auf. So wurden bis heute sechs verschiedene Stoffwechselwege zur CO₂-Fixierung beschrieben, drei davon allein in den letzten sechs Jahren [4]. Inzwischen kennen wir auch drei verschiedene Stoffwechselwege zur Umwandlung des zentralen Intermediates Acetyl-CoA in Biomasse [5, 6].

Diese „neu“ entdeckte Diversität im mikrobiellen Stoffwechsel macht deutlich, dass es keine uniforme Biochemie in Mikroorganismen gibt, sondern dass viele verschiedene Varianten für ein und denselben Stoffwechselprozess im Laufe der Evolution entstanden sind. Dies zeigt aber auch, dass es grundsätzlich möglich ist, komplett neue, synthetische Stoffwechselwege in Mikroorganismen zu etablieren. Warum aber sollten wir dies tun? Ein Grund ist, dass natürlich entstandene Stoffwechselwege das Produkt eines zufälligen Prozesses sind und dass die Natur im Angesicht der unzähligen möglichen Kombinationen von Enzymen und Proteinen viele Möglichkeiten gar nicht testen konnte.

In den letzten Jahren haben verschiedene theoretische Studien künstliche Stoffwechselvarianten aufgezeigt, mit deren Hilfe es möglich sein sollte, schneller und mit verbesserter Energieeffizienz CO₂ fixieren zu können als ihre natürlich entstandenen Gegenstücke [7, 8]. Diese synthetische Vorgehensweise ist neu für die Biologie und orientiert sich am Prinzip der Retrosynthese-Planung, wie es schon seit Jahrzehnten in der synthetisch-organischen Chemie verwendet wird. Das Interessante hierbei ist, dass

viele dieser theoretischen Stoffwechselwege anhand rein thermodynamischer und kinetischer Überlegungen entworfen wurden. In ihrem Design berücksichtigen diese Varianten nicht etwa nur real existierende Enzymreaktionen, sondern alle biochemisch denkbaren Transformationen [3].

Auffinden und Erzeugen von neuen Enzymen für neue Stoffwechselwege

Um die theoretischen Stoffwechselentwürfe zu realisieren, müssen daher zunächst einmal entsprechende Enzyme für jeden einzelnen Schritt dieser Designer-Stoffwechselwege gefunden werden. Viele Transformationen sind bereits in Datenbanken wie etwa der *Braunschweig Enzyme Database* (BRENDA) gelistet, die wir gezielt nach einzelnen Enzymreaktionen durchsuchen. Wie können aber Enzyme gefunden werden, die bisher noch nicht beschrieben wurden? In unserem Labor verfolgen wir dazu verschiedene Strategien: Zum einen durchsuchen wir existierende Enzymfamilien nach katalytischer Diversität und neuen Reaktionen. Durch die unzähligen (Meta-)Genomsequenzierungsprojekte gibt es in vielen Enzymsuperfamilien eine stetig wachsende Zahl unbekannter, diverser Vertreter, die es zu charakterisieren gilt.

Eine andere Strategie ist es, durch gezielte Mutagenese die gesuchte Aktivität in einem existierenden Enzym zu erzeugen, also aus bestehenden Enzymen neue abzuleiten. Durch gezielte Aminosäuremutationen konnten wir beispielsweise kürzlich eine Acyl-CoA-Dehydrogenase in eine Oxidase umwandeln [8]. In einem anderen Fall konnten wir durch das Schließen einer Bindetasche die Substratpartner einer Acyl-CoA-Oxidase gezielt einschränken, um eine spezifischere Propionyl-CoA-Oxidase zu erzeugen [8]. Über rationale Modifikationen erzeugten wir neue CoA-Ligasen zur Aktivierung kleiner Säuren zum entsprechenden CoA-Ester. Schließlich gelang es uns in zwei weiteren Fällen, ausgehend von Kristallstrukturen und dreidimensionalen Modellen des aktiven Zentrums das Substratspektrum verschiedener Carboxylasen gezielt zu erweitern, damit diese neue Reaktionen katalysieren [9].

Der gezielte Umbau von aktiven Zentren erlaubt es, relativ einfach neue Enzymaktivitäten zu etablieren, dennoch sind diese „neuen“ Enzyme in ihrer katalytischen Effizienz limitiert. Um die Katalyse unserer maßgeschneiderten Enzyme zu verbessern, können weitere Mutationen eingefügt und über Hochdurchsatzmethoden bzw. geeignete

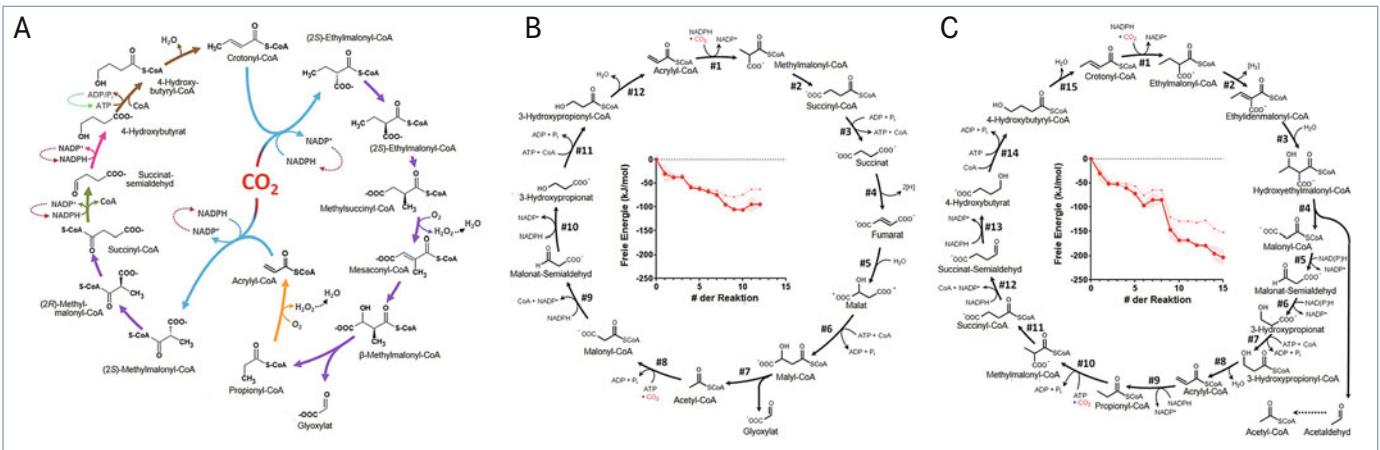
Wachstumsscreens Varianten mit erhöhter Effizienz gesucht werden [10].

Künstlicher Metabolismus: aus dem Reagenzglas in den Organismus

Nach erfolgreicher Identifizierung der einzelnen Enzyme rekonstituieren wir den künstlichen Stoffwechselweg zunächst im Reagenzglas. Dieser Schritt ist notwendig, um das Zusammenspiel der einzelnen Enzyme im Stoffwechselweg zu verstehen und zu optimieren. Unsere Erfahrung zeigt, dass viele Enzyme Seitenreaktionen besitzen, die mit der Zeit unerwünschte Intermediate anhäufen, die den künstlichen Stoffwechselweg zum Erliegen bringen. Durch das Ersetzen einzelner Enzyme mit verbesserten Varianten oder durch das Hinzufügen weiterer Reaktionssequenzen, die wie eine Art „Korrekturschleifen“ unerwünschte Intermediate in den ursprünglich geplanten Stoffwechselweg zurückführen, kann die Effizienz künstlicher Stoffwechselwege erheblich gesteigert werden. Dieses Prinzip der Korrektur von Seitenreaktionen wird auch als *metabolic proofreading* bezeichnet [3, 8].

Mithilfe von *in vitro*-Optimierung konnten wir kürzlich im Reagenzglas einen künstlichen Stoffwechselweg zur Fixierung von CO₂ realisieren, den CETCH-Zyklus (**Abb. 2**). Der CETCH-Zyklus besteht aus 17 Enzymen aus neun verschiedenen Organismen und umfasst drei maßgeschneiderte Enzyme [8]. Theoretische Überlegungen zeigen, dass dieser künstliche Stoffwechselweg pro fixiertem CO₂-Molekül 20 Prozent weniger Energie benötigt als der Calvin-Zyklus, wie er in Pflanzen, Algen und Bakterien evolvierte. In einem anderen Projekt demonstrierten wir zusammen mit internationalen Partnern einen synthetischen Stoffwechselweg im Reagenzglas, der dem Verlust von fixiertem Kohlenstoff während der Photorespiration entgegenwirkt und dabei sogar zusätzliche CO₂-Fixierung erlaubt. Auch hier zeigen theoretische Überlegungen, dass durch diesen künstlichen Stoffwechselweg dem photosynthetischen Organismus 20 bis 30 Prozent mehr Energie zur Verfügung stehen sollte (unpubliziert). Diese beiden Beispiele zeigen das generelle Potenzial eines synthetischen Metabolismus, auch wenn die Funktionalität im lebenden Organismus natürlich erst noch erbracht werden muss.

Die Transplantation unserer künstlichen Stoffwechselwege vom Reagenzglas in den lebenden Organismus ist die nächste große Herausforderung. In ersten Versuchen haben



▲ **Abb. 2:** Designer-Stoffwechselwege zur synthetischen CO₂-Fixierung. **A**, der CETCH-Zyklus, der erste *in vitro* realisierte künstliche Zyklus zur Fixierung von CO₂ [8]. **B, C**, zwei weitere Designer-Stoffwechselwege zur CO₂-Fixierung, die bisher nur theoretisch existieren: der HOPAC-Zyklus (**B**) und der CHYME-Zyklus (**C**), inklusive ihrer vorhergesagten thermodynamischen Profile.

wir bereits dem nicht-CO₂-fixierenden Mikroorganismus *Methylobacterium extorquens* einen funktionellen Calvin-Zyklus zur CO₂-Fixierung eingepflanzt (unpubliziert). Aus diesen Experimenten versuchen wir Strategien abzuleiten, die uns helfen können, auch den CETCH-Zyklus *in vivo* zu realisieren. Das langfristige Ziel unserer Forschung ist es, diejenigen Prinzipien zu verstehen, die es uns erlauben, einen beliebigen Stoffwechselweg am Reißbrett zu entwerfen und danach in einem lebenden Organismus zu realisieren [2, 8]. Dies könnte in Zukunft ganz neue Anwendungen in der Biotechnologie, Pharmaindustrie oder Medizin eröffnen [2]. Gleichzeitig ist dieser Nachweis aber auch eine notwendige Voraussetzung, um den Schritt in der Biologie von einer analytisch-deskriptiven zu einer synthetisch-konstruktiven Wissenschaft erfolgreich zu meistern, wie es bereits zuvor der Physik und der Chemie gelang.

Danksagung

Ich danke allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für den Teamgeist und die ständige Neugier, in das Unbekannte vorzustoßen. Mein Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen, Mentorinnen und Mentoren in Freiburg, Illinois, Zürich und Marburg, insbesondere Georg Fuchs, Birgit Alber und Julia Vorholt. Der Max-Planck-Gesellschaft, der

Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Schweizerischen Nationalfonds, der Gebert-Rüf-Stiftung sowie dem Europäischen Research Council sei für die finanzielle Förderung gedankt; Annette, Flo und Jule für ihre Geduld.

Literatur

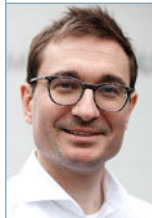
[1] DFG-Magazin, Synthetische Biologie, http://www.dfg.de/dfg_magazin/forschungspolitik_standpunkte_perspektiven/synthetische_biologie/index.html
 [2] Schwander T, Erb TJ (2016) Do it your (path)way – synthetische Wege zur CO₂-Fixierung. *BIOspektrum* 22:590–592
 [3] Erb TJ, Jones PK, Bar-Even A (2017) Synthetic metabolism: metabolic engineering meets enzyme design. *Curr Opin Chem Biol* 37:56–62
 [4] Erb TJ (2011) Carboxylase and carboxylase-like proteins in natural and synthetic pathways. *Appl Env Microbiol* 77:8466–8477
 [5] Erb TJ, Berg IA, Brecht V et al. (2007) Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10631–10636
 [6] Klimova M, Bükmez Ö, Thomas LK et al. (2011) A methylaspartate cycle in haloarchaea. *Science* 331:334–337
 [7] Bar-Even A, Noor E, Lewis NE et al. (2010) Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8889–8894

[8] Schwander T, Schada von Borzyskowski L, Burgener S et al. (2016) A synthetic pathway for the fixation of carbon dioxide *in vitro*. *Science* 354:901–904
 [9] Peter DM, Schada von Borzyskowski L, Kiefer P et al. (2015) Screening and engineering the synthetic potential of carboxylating reductases from central metabolism and polyketide biosynthesis. *Angew Chem* 54:13457–13461
 [10] Obexer R, Godina A, Garrabou X et al. (2016) Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase. *Nat Chem* 9:50–56
 [11] Erb TJ, Zarzycki J (2017) Biochemical and synthetic biology approaches to improve photosynthetic CO₂-fixation. *Curr Opin Chem Biol* 34:72–79
 [12] Keller MW, Schut GJ, Lipscomb GL et al. (2013) Exploiting microbial hyperthermophilicity to produce an industrial chemical, using hydrogen and carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:5840–5845

Korrespondenzadresse:

Dr. Tobias J. Erb
 Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
 Karl-von-Frisch-Straße 10
 D-35043 Marburg
 Tel.: 06421-178-426
 Fax: 06421-178-999
 toerb@mpi-marburg.mpg.de
 www.mpi-marburg.mpg.de/erb

AUTOR



Tobias J. Erb

1999–2005 Chemie- und Biologiestudium an der Universität Freiburg. 2005–2009 Doktorarbeit an der Universität Freiburg und der Ohio State University, USA, ausgezeichnet mit dem VAAM-Promotionspreis 2010. 2009–2011 Postdoc am Institute for Genomic Biology, University of Illinois, USA. 2011–2014 Nachwuchsgruppenleiter an der ETH Zürich, Schweiz. Seit 2014 Leiter der Gruppe „Biochemie und Synthetische Biologie des Mikrobiellen Metabolismus“ am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg.