

Künstliche CO₂-Fixierungswege

Schöne neue Biologie? Synthetisch-biologische Ansätze zur CO₂-Umwandlung

IRIA BERNHARDSGRÜTTER, GABRIELE STOFFEL, TOBIAS J. ERB
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRICHE MIKROBIOLOGIE, SYNMIKRO –
ZENTRUM FÜR SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE, MARBURG

Over billions of years nature has evolved efficient biological systems. Synthetic biology aims at developing human-made mimics of these systems that provide alternative, more efficient solutions to natural processes, or perform tasks not (yet) found in natural systems. Here we discuss how synthetic biology can be used to design and realize novel enzymes and metabolic networks for the capture and conversion of carbon dioxide. We further discuss the strategies and challenges for transplanting these new CO₂-fixing processes into natural and artificial cells.

DOI: 10.1007/s12268-020-1331-4
© Die Autoren 2020

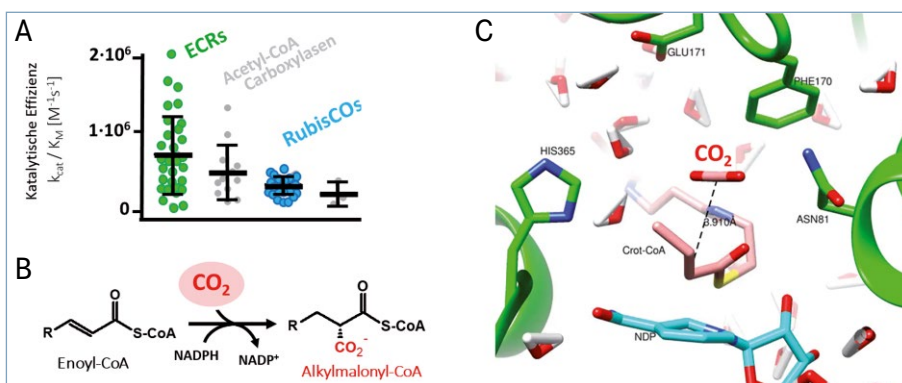
■ Evolution ist eine innovative Kraft, mit deren Hilfe die Natur über Jahrmilliarden effiziente biologische Systeme hervorgebracht hat. Allerdings unterliegt sie dem Zufallsprinzip und historischer Stringenz. Diese Arbeitsmechanismen der Evolution führen mit der fortschreitenden Entwicklung biologischer Systeme eher zur Optimierung

bestehender Lösungen und weniger zu radikal neuen Erfindungen. Überspitzt ausgedrückt wird so mit der Zeit aus der reaktionären eine konservative Kraft, die es verhindert, dass die Natur den gesamten möglichen Lösungsraum erforschen kann.

Ein Beispiel ist die photosynthetische CO₂-Fixierung, der Calvin-Zyklus, in Pflan-

zen, Algen und Bakterien. Obwohl durch diesen über Jahrmilliarden evolvierten Prozess jährlich mehr als 400 Gigatonnen atmosphärisches CO₂ umgewandelt werden, ist er – objektiv betrachtet – längst nicht perfekt. Das zentrale CO₂-fixierende Enzym in der Photosynthese, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), ist ein relativ langsamer Biokatalysator, der nur etwa fünf CO₂-Moleküle pro Sekunde umsetzt. Darüber hinaus zeigt die RubisCO auch noch eine 20-prozentige Fehlerrate mit Sauerstoff, was die Photosynthese unter optimalen Bedingungen limitiert. Anders ausgedrückt: Der Motor der Photosynthese läuft langsam und stottert. Im Laufe der Evolution haben Mikroorganismen zwar einige Alternativen zum Calvin-Zyklus entwickelt, allerdings konnte das tatsächliche Potenzial, das sich aus der freien Kombination der natürlich existierenden CO₂-fixierenden Enzyme ergeben würde, bei Weitem nicht ausgeschöpft werden – dazu sind die kombinatorischen Möglichkeiten in der Biologie einfach zu vielfältig.

An dieser Stelle knüpft das relativ junge Feld der synthetischen Biologie an, deren Ziel es ist, alternative biologische Lösungen zu erschaffen, die von der Evolution (noch) nicht realisiert werden konnten. Mit diesem konstruktiven Ansatz reiht sich die synthetische Biologie ganz in die Entwicklung anderer Naturwissenschaften ein, wie der Physik oder Chemie, in denen sich nach einer ersten Phase des grundlegenden Erkenntnisgewinns die Anwendung der gefundenen Prinzipien anschloss, um neue Moleküle, Materialien und Systeme zu erzeugen. Auf lange Sicht hat der synthetische Ansatz in der Biologie das Potenzial, Sprunginnovationen zu ermöglichen und eine der Schlüsseltechnologien unserer Zeit zu werden – ähnlich wie das Ingenieurwesen bzw. die Synthesechemie im 19. bzw. 20. Jahrhundert. In unserem Labor konzentrieren wir uns darauf, unter Zuhilfenahme synthetischer Biologie alternative Lösungen zu der natürlichen Photosynthese zu erkunden.



▲ **Abb. 1:** Biochemie der CO₂-Fixierung. **A,** Vergleich der katalytischen Effizienz verschiedener Carboxylasen. Enoyl-CoA-Carboxylasen/Reduktasen (ECRs) gehören zu den schnellsten CO₂-fixierenden Enzymen, die bisher identifiziert wurden. Sie sind bis zu 20-mal schneller und viermal katalytisch effizienter als die RubisCO aus der natürlichen Photosynthese. **B,** CO₂-Fixierungsreaktion der ECR. Die ECR katalysiert die Bildung einer C-C-Bindung zwischen einem Enoyl-CoA-Ester und einem CO₂-Molekül. **C,** CO₂-Bindetasche der ECR aus *Kitasatospora setae*. Gezeigt ist die Kristallstruktur des Enzyms in einer Simulation der Interaktion des CO₂-Moleküls mit dem Proteingerüst. Asparagin-81 interagiert mit einem Sauerstoff des CO₂-Moleküls, während Glutamat-171 und Histidin-365 über ein fest gebundenes Kristallwasser mit dem anderen Sauerstoff des CO₂-Moleküls interagieren. Phenylalanin-170 schirmt die CO₂-Bindetasche gegen Wasser ab.

Neue CO₂-fixierende Enzyme

Gibt es Carboxylasen, die besser und akkurater CO₂ umwandeln können als die RubisCO in der natürlichen Photosynthese? In der Tat bietet die Natur Alternativen. Ein Beispiel sind die Enoyl-CoA-Carboxylasen/Reduktasen (ECRs), die wir vor ca. zehn Jahren in Alphaproteobakterien entdeckten. Sie weisen eine ca. 20-mal schnellere Katalyserate auf als RubisCO und können bis zu 100 CO₂-Moleküle pro Sekunde umsetzen. Darüber hinaus besitzen diese Enzyme keine Fehlreaktion mit O₂ (**Abb. 1**).

Was macht ECRs zu hocheffizienten Carboxylasen? In den letzten Jahren haben wir uns damit beschäftigt, die Katalyse dieser Enzyme in Einzelschritte aufzulösen. Wir wissen heute, dass ECRs zuerst ihr Substrat reduktiv aktivieren, um eine starke, fast irreversible Treibkraft zur anschließenden Reaktion des Substrats mit dem CO₂ aufzubauen.

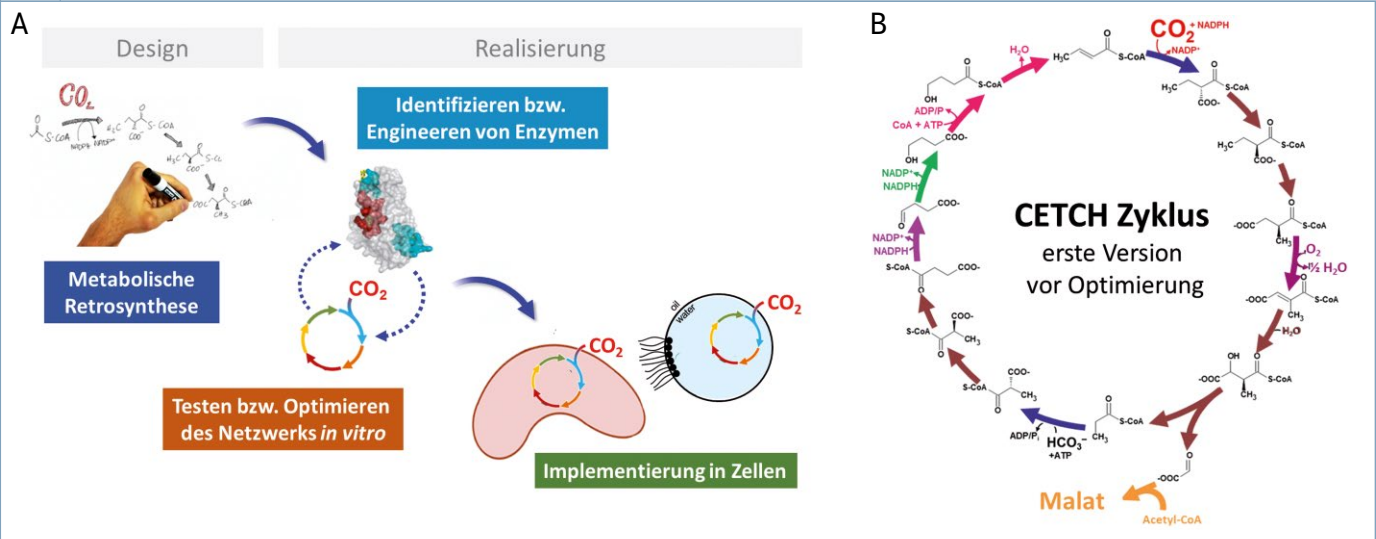
Wie kommt das CO₂ in die Katalyse? Durch Kombination von Strukturbiologie, molekularen Simulationen und biochemischen Methoden gelang es uns kürzlich, die CO₂-Bindetasche von ECRs zu charakterisieren [1]. Die Bindetasche dieser Enzyme besteht insgesamt aus vier Aminosäuren, die zusammenwirken, um das CO₂ im aktiven Zentrum zu positionieren. Dabei sind zwei unterschiedliche Prinzipien wichtig: zum einen attraktive elektrostatische Wechselwirkungen, um das CO₂ in der aktiven Seite zu akkommodieren; und zum anderen der Ausschluss von Wassermolekülen durch hydrophobe Aminosäuren, um ein verfrühtes Abbrechen der Carboxylierungsreaktion zu verhindern (**Abb. 1**).

Getreu dem Motto Max Plancks „dem Anwenden muss das Erkennen vorausgehen“, haben wir uns im Weiteren damit beschäftigt, die CO₂-Bindetasche in das Gerüst anderer Enzyme zu übertragen, um neue Carboxylasen zu erzeugen. In der Tat konnten wir zeigen, dass durch den rationalen Umbau des

aktiven Zentrums gewöhnlicher Reduktasen, diese mit einer CO₂-Fixierungsaktivität ausgestattet werden können [2]. Bemerkenswerterweise waren die katalytischen Eigenschaften, die wir mit unseren Designer-Carboxylasen erreichten, vergleichbar mit denen natürlich entstandener Carboxylasen. Diese Versuche zeigen, dass es in der Tat grundsätzlich möglich ist, neue CO₂-fixierende Enzyme mittels *Protein Engineering* zu erschaffen.

Neue CO₂-fixierende Stoffwechselwege

Eine effiziente Carboxylase macht noch keinen CO₂-fixierenden Stoffwechselweg. Um dies zu erreichen, ist es notwendig, um den CO₂-fixierenden Schritt herum ein komplett neues metabolisches Netzwerk aufzubauen. Dies kann mittels metabolischer Retrosynthese geschehen, ein Verfahren, durch das neue Stoffwechselwege gewissermaßen am Reißbrett entworfen



▲ **Abb. 2:** Design und Realisierung künstlicher CO₂-Fixierungswege. **A**, In einer theoretischen Phase werden Stoffwechselwege entworfen, erst danach werden die einzelnen Enzyme zur Realisierung gesucht bzw. engineeriert. Im Anschluss wird das gesamte Netzwerk rekonstruiert, getestet und in mehreren Schritten optimiert, und es findet die Implementierung in Zellen statt. **B**, Reaktionsschema der ersten Version des CETCH-Zyklus, eines künstlichen CO₂-Fixierungsstoffwechselweges, der auf einer ECR-Reaktion basiert und bereits *in vitro* realisiert wurde [3]. Die einzelnen Farben indizieren die unterschiedliche Herkunft der einzelnen Enzyme aus verschiedenen Organismen.

und dann in die Realität umgesetzt werden (**Abb. 2**).

Basierend auf den ECRs entwarfen wir verschiedene hypothetische CO₂-Fixierungsstoffwechselwege, die aufgrund thermodynamischer und kinetischer Überlegungen effizienter sein sollten als der Calvin-Zyklus der natürlichen Photosynthese [3]. Im Anschluss an diese theoretische Phase realisierten wir in einem experimentellen Ansatz einen dieser theoretischen Stoffwechselwege – den CETCH Zyklus – im Labor (**Abb. 2**). Dazu war es notwendig, die entsprechenden Enzyme zu finden, die die einzelnen Reaktionen katalysieren konnten. Insgesamt identifizierten und kombinierten wir 14 verschiedene Enzyme aus sechs verschiedenen Organismen und ein maßgeschneidertes Enzym *in vitro*, um eine erste funktionale Version des Zyklus zu rekonstruieren.

Nach diesem *Proof of Principle* war es nötig, die einzelnen Enzyme weiter aufeinander abzustimmen, um den Gesamtfluss durch den Zyklus zu verbessern. In mehreren Runden von Testen und Optimieren gelang es uns schließlich, eine Version 5.4 des CETCH-Zyklus zu erzeugen, die gegenüber den ersten Versionen eine 20-fach verbesserte CO₂-Effizienz aufwies. Version 5.4 des CETCH-Zyklus besteht insgesamt aus 17 Enzymen, die aus neun verschiedenen Organismen stammen, darunter drei maßgeschneiderte Enzyme. Der CETCH-Zyklus ist ca. 20 Prozent energieeffizienter als der Calvin-Zyklus und zeigt bereits eine *in vitro*-Kinetik, die vergleichbar mit Messungen der natürlichen Photosynthese im Reagenzglas ist (**Abb. 2**).

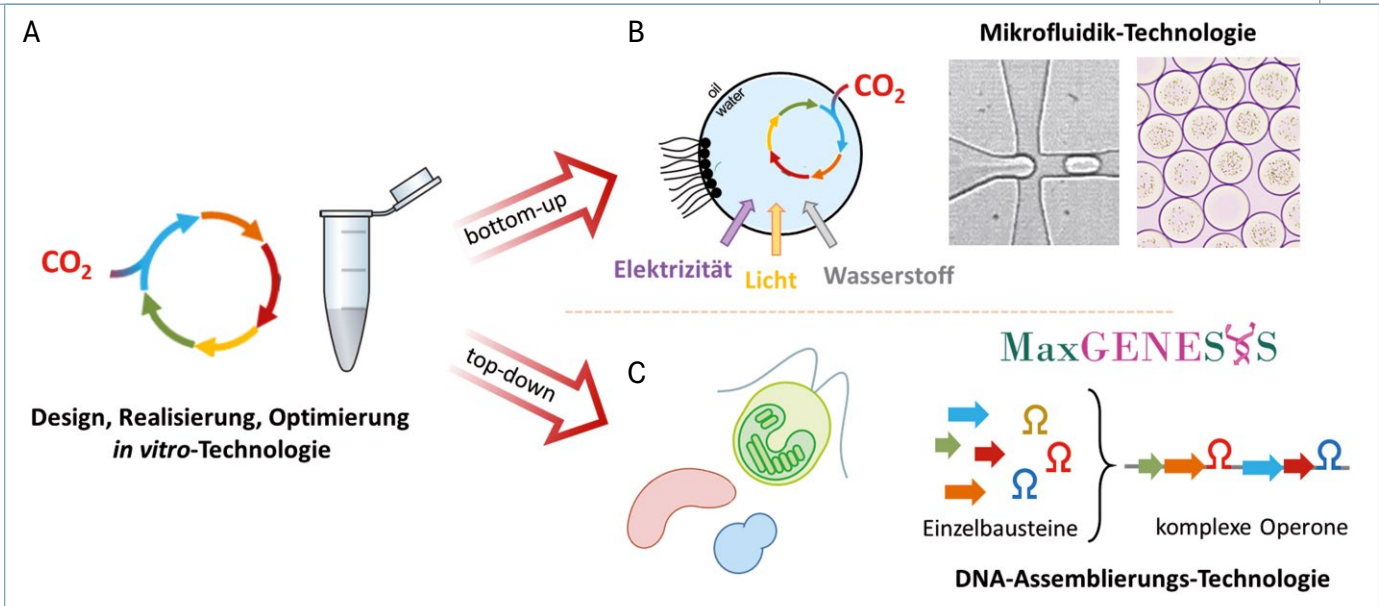
Neue CO₂-fixierende Zellen und künstliche Chloroplasten

Nachdem der prinzipielle Beweis *in vitro* erbracht wurde, dass wir alternative Möglichkeiten zur photosynthetischen CO₂-Fixierung erschaffen können, bleibt die Frage, wie wir in Zukunft solche künstlichen Netzwerke wie den CETCH-Zyklus in einen zellulären Kontext überführen können. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten: die Implementierung des künstlichen Stoffwechselweges in eine lebende Zelle oder das Konstruieren einer „künstlichen Zelle“ um den Zyklus herum (**Abb. 3**).

Obwohl der Versuch, ein komplexes metabolisches Netzwerk mit mehr als einem Dutzend Enzymen zur CO₂-Umwandlung in lebende Zellen einzupflanzen, auf den ersten Blick wie eine „metabolische Herztransplantation“ anmutet, scheint dieser Ansatz nicht grundsätzlich unmöglich zu sein. Erst kürzlich wurde z. B. gezeigt, dass es möglich ist, den Stoffwechsel von *Escherichia coli* und der Hefe *Pichia pastoris* so umzuprogrammieren, dass die Mikroorganismen ihre Biomasse über einen transplantierten Calvin-Zyklus vollständig aus CO₂ bilden [4, 5] (siehe auch den Beitrag „Mikroorganismen in den Schlagzeilen“ in dieser Ausgabe). Auch wenn in diesen Versuchen erst einmal „nur“ zwei bis drei Enzyme in den jeweiligen Organismus eingepflanzt wurden und der CO₂-fixierenden Fähigkeit eine mehrjährige experimentelle Evolution vorausging, lässt dieser Erfolg hoffen, dass auch der komplexere CETCH-Zyklus zukünftig transplantiert werden kann. Dies wird auch neue Methoden und Werkzeuge brauchen, wie beispielsweise

synthetische Chromosomen bzw. spezielle extrachromosomale Elemente, die wir in Zusammenarbeit mit dem Joint Genome Institute des US Department of Energy, Berkeley, und der Gruppe von Anke Becker am Zentrum für Synthetische Mikrobiologie in Marburg entwickeln [6]. Die automatisierte Assemblierung von DNA-Elementen wird zukünftig in einer DNA-Synthese-Facility (DNA foundry) erfolgen, die durch Förderung der Max-Planck-Gesellschaft gerade an unserem Institut in Marburg eingerichtet wird.

Den komplementären Ansatz, die *bottom-up*-Konstruktion von künstlichen CO₂-fixierenden Zellen bzw. zellähnlichen Objekten, verfolgen wir im Rahmen des MaxSynBio-Netzwerks [7]. Um dieses große Ziel zu erreichen, bedarf es ebenfalls technologischer Entwicklungen. Zur Einkapselung unserer künstlichen Reaktionsnetzwerke fokussieren wir uns vor allem auf Mikrofluidik, mit deren Hilfe wir bereits einzelne Enzyme und kleinere Reaktionskaskaden erfolgreich in Wasser-in-Öl-Tröpfchen einbringen konnten. Durch das Ko-Enkapsulieren membrangebundener Systeme zur Regeneration von Redox-Kofaktoren und ATP können die Reaktionsnetzwerke in Wasser-in-Öl-Tröpfchen energetisiert und angetrieben werden [8]. Versuche in unserem Labor, in denen wir einen modifizierten CETCH-Zyklus zusammen mit photosynthetischen Membranen mittels Mikrofluidik enkapsulierten, zeigten, dass es in der Tat möglich ist, in den Wasser-in-Öl-Tröpfchen lichtgetriebene CO₂-Fixierung zu betreiben. Aufbauend auf diesen Versuchen setzen nun weitere Optimierungen und Verbesserungen an, um mittelfristig



▲ Abb. 3: Von *in vitro*-CO₂-Fixierungswegen zu CO₂-fixierenden Zellen. **A**, Design, Realisierung und Optimierung durch *in vitro*-Technologie. In einer dezidierten *in vitro*-Phase wird der künstliche Stoffwechselweg entwickelt, bevor er dann in natürliche bzw. künstliche Zellen transplantiert wird. **B**, Implementierung in künstliche Zellen. Im *bottom-up*-Ansatz werden die Enzyme des Stoffwechselweges durch Mikrofluidik-Technologie in Wasser-in-Öl-Tröpfchen verpackt. Diese künstlichen Zellen können durch externe Energiequellen versorgt werden. **C**, Implementierung in natürliche Zellen. Im *top-down*-Ansatz werden die benötigten Gene durch fortgeschrittene genetische Methoden, z. B. mittels einer DNA foundry, zu komplexen Operons oder extrachromosomalen Elementen assembliert und dann in entsprechende Wirtsorganismen eingebracht.

einen künstlichen Chloroplasten zu erzeugen, der gezielt für die Synthese verschiedener Moleküle aus CO₂ programmiert werden kann. Obwohl diese Systeme sicher noch weit von einer Anwendung entfernt sind, sind dies doch erste, kleine Schritte auf dem Weg zu neuartigen, komplexen katalytischen Systemen mit lebensähnlichen Eigenschaften, wie sie schon vor mehr als 100 Jahren von Emil Fischer „halb im Traum“ vorhergesagt wurden, „wenn sich Chemiker und Biologe erfolgreich verbinden“ [9]. ■

Literatur

- [1] Stoffel GMM, Saez DA, DeMirici H et al. (2019) Four amino acids define the CO₂ binding pocket of enoyl-CoA carboxylases/reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:13964–13969
- [2] Bernhardsgrütter I, Schell K, Peter DM et al. (2019) Awakening the sleeping carboxylase function of enzymes: engineering the natural CO₂-binding potential of reductases. *J Am Chem Soc* 141:9778–9782
- [3] 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
- [4] Gleizer S, Ben-Nissan R, Bar-On YM et al. (2019) Conversion of *Escherichia coli* to generate all biomass carbon from CO₂. *Cell* 179:1255–1263
- [5] Gassler T, Sauer M, Gasser B et al. (2019) The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. *Nat Biotechnol*, doi: 10.1038/s41587-019-0363-0
- [6] Schwille P, Spatz J, Landfester K et al. (2018) MaxSynBio: avenues towards creating cells from the bottom up. *Angew Chem Int Ed* 57:13382–13392
- [7] Carrillo M, Wagner M, Petit F et al. (2019) Design and control of extrachromosomal elements in *Methyloburum extorquens* AM1. *ACS Synth Biol* 8:2451–2456
- [8] Beneyton T, Krafft D, Bednarz C et al. (2018) Out-of-equilibrium microcompartments for the bottom-up integration of metabolic functions. *Nat Commun* 9:2391
- [9] Fischer E (1924) Die Kaiser-Wilhelm-Institute und der Zusammenhang von organischer Chemie und Biologie. Springer, Berlin, S 796–809

Funding: Open Access funding provided 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>.

Korrespondenzadresse:

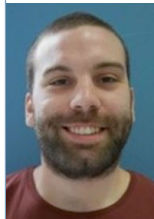
Prof. Dr. Tobias J. Erb
Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10
D-35043 Marburg
toerb@mpi-marburg.mpg.de
www.mpi-marburg.mpg.de/erb

AUTOREN



Iria Bernhardsgrütter

Masterstudium Mikrobiologie (M. Sc.) an der ETH Zürich, Schweiz. Seit 2016 Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie im Rahmen des SFB 987, Marburg.



Gabriele Stoffel

Masterstudium Chemische Biologie (M. Sc.) an der ETH Zürich, Schweiz. Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg; dort seit 2019 Postdoktorand.



Tobias J. Erb

Biologie- und Chemiestudium. Doktorarbeit in Mikrobiologie, Universität Freiburg und Ohio State University, USA. Postdoc an der University of Illinois, USA. Juniorgruppenleiter an der ETH Zürich, Schweiz. Gruppenleiter und seit 2017 Direktor am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg.