

# Hefe – eine universelle chemische Mikrofabrik

Dr. Harald Heider, Dr. Markus Schwab und Prof. Dr. Jutta Heim; Evolva SA, Reinach, Schweiz

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird durch den Menschen seit Jahrtausenden zur Produktion unterschiedlichster Nahrungs- und Genussmittel eingesetzt. Ihr Beitrag zur alkoholischen Gärung in der Wein- und Bierproduktion oder bei der Herstellung von Brot ist auch dem Laien geläufig. Weniger bekannt ist die Tatsache, dass sich Bäckerhefe ebenfalls hervorragend für die Produktion chemischer Moleküle eignet, die in der Natur nur in geringen Mengen vorkommen, schwierig zu isolieren sind oder bisher noch nicht entdeckt wurden. Evolva hat es sich zur Aufgabe gemacht, *Saccharomyces cerevisiae* als Mikrofabrik für die Herstellung solcher Moleküle zu entwickeln. Hierfür bedienen wir uns der synthetischen Biologie, um die Hefe für diese bisher nur ansatzweise genutzten Zwecke entsprechend umzuprogrammieren. Mit Hilfe künstlicher Chromosomen bauen wir nicht nur komplette Biosynthesewege aus Pflanzen oder anderen Organismen in die Hefe ein, wir können auch völlig neuartige Kombinationen enzymatischer Aktivitäten zur Herstellung bisher unbekannter Moleküle in die Hefe einschleusen.

*Saccharomyces cerevisiae* gehört zur Zeit sicher zu den bestuntersuchten Organismen unseres Planeten. Die Hefe war der erste Eukaryot dessen Genom komplett sequenziert wurde; sie besitzt ca. 6.000 Gene, die auf 16 Chromosomen verteilt sind. *S. cerevisiae* lässt sich leicht mit einer Reihe genetischer Methoden modifizieren, ist sehr robust und kann Produkte im Gramm-Maßstab herstellen. Zudem wird sie als GRAS (generally regarded as safe) eingestuft und ist deshalb auch im Nahrungsmittelbereich bestens einsetzbar. Beispiele für erfolgreiche heterologe Biosynthese in Hefe

sind Alkohole wie *n*-Butanol oder Ethanol, ausgehend von dem natürlichen Holzabfallprodukt Hemizellulose. Aber auch das Malaria-medikament Artemisinin oder Taxadien, eine Vorstufe des Krebsmittels Taxol, kann in Hefe produziert werden. Hinzu kommen eine große Zahl kommerziell interessanter chemischer Verbindungen aus anderen Anwendungsgebieten, wie etwa der Aromastoff Vanillin, Patchoulol oder Flavonoide<sup>2+ Ref.</sup>.

Im Gegensatz zur Herstellung solcher Produkte in Bakterien, die verschiedentlich auch für die Synthese von sekundären Pflanzenme-

taboliten eingesetzt werden, ist die Produktion in Hefe wesentlich sicherer – speziell im Hinblick auf Beiprodukte bei der nachfolgenden Isolation der Substanzen. Darüber hinaus können funktionsfähige komplexe pflanzliche Stoffwechselwege im Eukaryot *S. cerevisiae* leichter als in Bakterien etabliert werden. Prokaryotischen Bakterienzellen fehlen zum Beispiel Gene für posttranslationale Modifikationen, die für die Aktivität eukaryotischer Enzyme essentiell sind. Zudem können Hefen größere DNA-Fragmente aufnehmen – ein Phänomen das wir mit unserer Technologie nutzen. Die gezielte Einführung großer Mengen an genetischem Material in die Hefe in Form von künstlichen Chromosomen eröffnet völlig neuartige Möglichkeiten für die Herstellung unterschiedlichster Verbindungen<sup>3</sup>.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, um komplexe heterologe Stoffwechselwege mit Hilfe von Plasmiden in Bäckerhefe einzubauen. Ein Konsortium universitärer und industrieller Forscher hat eine ganze Reihe von Plasmiden in Bäckerhefe eingeschleust, die den kompletten Stoffwechselweg zur Produktion des klinisch relevanten Steroidhormons Cortisol enthielten – ausgehend vom hefeeigenen Primärmetabolit Ergosterol<sup>4</sup>. Leider ist das Verfahren äußerst komplex, die Ausbeute eher gering und die Stabilität der eingeschleusten Gene in der Hefe aufgrund der Vielzahl der notwendigen Selektionsmarker vermutlich nicht ausreichend für eine industrielle Nutzung.

Mit unserer eYAC (expressable Yeast Artificial Chromosomes)-Technologie haben wir die Möglichkeit, Hunderte von Genen gleichzeitig in die Hefe einzuschleusen und damit komplette mehrstufige Biosynthesewege in einem Schritt aufzubauen (Abb. 1). Wir haben diesen Ansatz beispielsweise erfolgreich für die Herstellung pflanzlicher Flavonoide in Hefe genutzt<sup>5</sup>. Zusätzlich sind wir auch in der Lage, unvollständige metabolische Synthesewege zu kompletieren. Hierzu verwenden wir – neben den speziell eingeführten bekannten Enzymen eines Biosynthesewegs – komplette Genbibliotheken aus Organismen, die einen gewünschten chemischen Metaboliten produzieren.

Die eYAC-Technologie wird momentan in zwei Hauptanwendungsgebieten eingesetzt: Etablierung von neuen Produktionswegen für bekannte Substanzen. Schwer zugängliche oder seltene und somit teure sekundäre Pflanzenmetabolite, wie zum Beispiel Patchoulol oder kalorienneutrale pflanzliche Süßstoffe, können in der Hefe in großen Quantitäten und sehr guter Reinheit biosynthetisch produziert werden. Hierzu werden die für die Biosynthese benötigten Gene via eYACs in die Hefe eingebracht.

Herstellung von bisher unbekanntem, pharmazeutisch aktiven Substanzen. Gene, die für Enzyme aus Stoffwechselsynthesewegen kodieren, werden mit cDNA-Bibliotheken aus unterschiedlichen Organismen kombi-

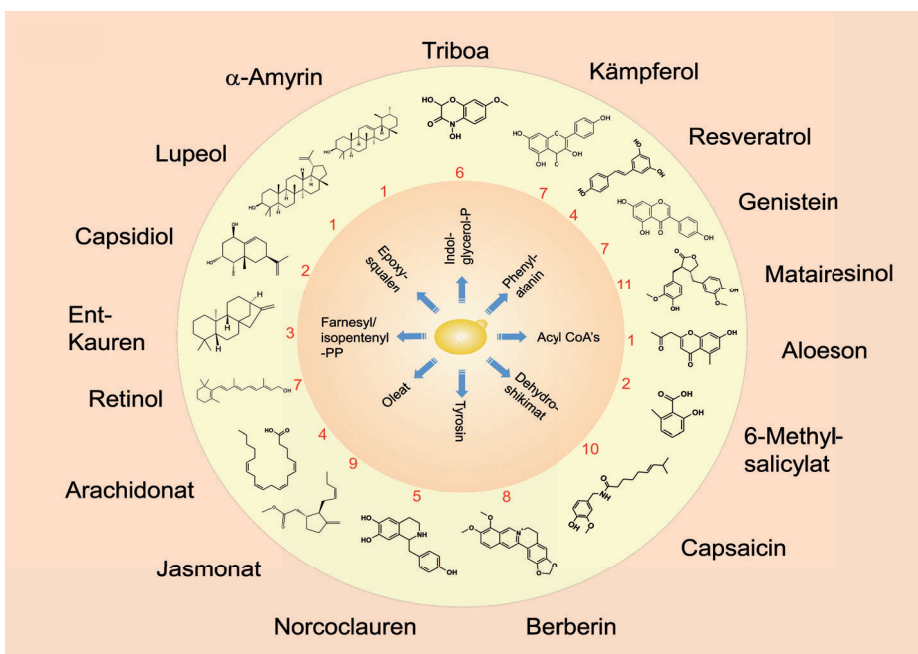
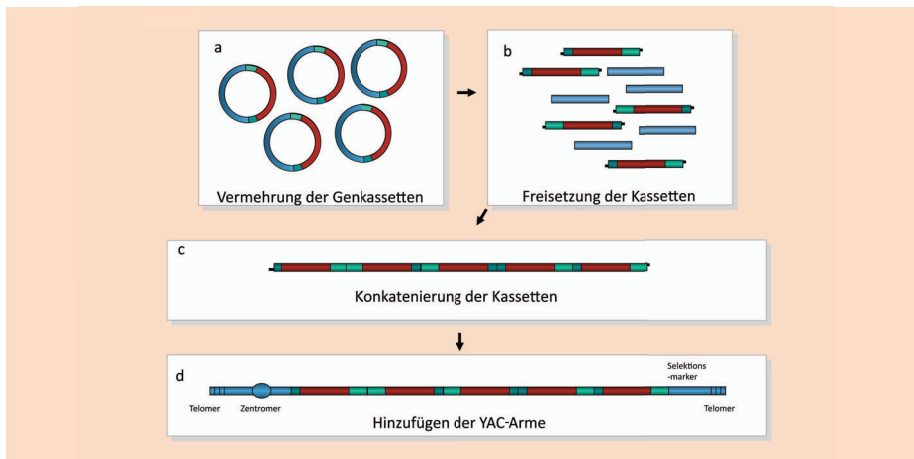


Abb. 1: Beispiele für neue Stoffwechselwege in Bäckerhefe. Ausgehend von einem hefeeigenen Stoffwechselmetaboliten werden mit Hilfe der in die Hefe eingeschleusten synthetischen Chromosomen völlig neuartige, in der Hefe nicht vorkommende Produkte hergestellt. Die Anzahl der für die neuen Moleküle notwendigen Biosyntheseschritte, ausgehend vom jeweiligen Hefemetaboliten, sind mit roten Zahlen angegeben.



**Abb. 2: eYAC-Technologie.** Zur Herstellung der synthetischen Hefechromosomen werden heterologe Gensequenzen mit hefespezifischen regulatorischen Sequenzen kombiniert und diese genetischen Einheiten („Genkassetten“) in Bakterien amplifiziert (a). Die Plasmide werden anschließend isoliert und die Genkassetten mit geeigneten Restriktionsenzymen freigesetzt (b). In einer Ligationsreaktion fügen wir Genkassetten (c) zusammen und vervollständigen die DNA-Fragmente mit geeigneten Chromosomenenden.

nirt und in die Hefe eingeschleust. Diese Mischung aus bekannten Synthesewegen und zusätzlichen enzymatischen Aktivitäten generiert eine große Anzahl von Katalysatoren enzymatischer Reaktionen, die eine hohe chemische Diversität der resultierenden Produkte garantiert. Durch die anschließende Kopplung der Biosynthese chemischer Verbindungen mit einem Screeningverfahren können funktionelle neue Moleküle identifiziert werden.

### eYAC-Technologie

Die eYAC-Technologie beruht auf der Herstellung von künstlichen Hefechromosomen außerhalb der Zelle und deren anschließender Einführung in die Hefe. Die künstlichen Chromosomen können sowohl isolierte Gene aus verschiedensten Organismen als auch *de novo* synthetisierte Gene beinhalten – zum Beispiel in den bevorzugten Hefecodons. Die kodierenden Sequenzen werden in Eingangsvektoren kloniert und mit hefeeigenen regulatorischen Elementen (Promotoren, Terminatoren) versehen. Üblicherweise verwenden wir induzierbare Promotoren, die es erlauben, die Genaktivität zu kontrollieren, aber auch konstitutiv aktive Promotoren finden Verwendung. Aus den somit entstandenen, plasmidbasierten Genbibliotheken werden die Expressionskassetten ausgeschnitten und in einer Ligationsreaktion zu linearen Konkatemeren in rein zufälliger Anordnung zusammengesetzt. Um diesen synthetischen DNA-Fragmenten die Eigenschaften von natürlichen Hefechromosomen zu verleihen, werden sie mit einem Zentromer, einem Replikationsursprung und mit Telomeren versehen. Zusätzlich verwenden wir Selektionsmarker, um transformierte Hefen isolieren zu können (Abb. 2). Wir sind mittlerweile in der

Lage, den Hefen zusätzliches genetisches Material in Form von künstlichen Chromosomen mit einer Länge von bis zu 300 000 Basenpaaren einzusetzen. Diese Chromosomen können zwischen 50 und 150 Genkassetten aufnehmen. Üblicherweise verwenden wir pro Schritt eines Biosynthesewegs mehrere homologe Enzyme aus verschiedenen Organismen, um die Chancen der Synthese der gewünschten Produkte zu erhöhen.

Besonderere Aufmerksamkeit bedürfen bei dieser Methodik die für die jeweiligen Genkassetten verwendeten Promotoren und Terminatoren. Würden immer die gleichen Sequenzen eingesetzt, bestünde bei der schieferen Anzahl der vorliegenden Genkassetten die Möglichkeit, dass durch den hefeeigenen Rekombinationsprozess Genkassetten verlorengingen.

Des weiteren muss analysiert werden, ob eventuelle Modifikationen im hefeeigenen Stoffwechsel für eine effiziente Produktion notwendig sind. Falls Zwischenstufen des neuen Biosynthesewegs von der Hefe in unbrauchbare Produkte umgewandelt werden, können die dafür verantwortlichen hefeeigenen Enzyme ausgeschaltet werden. Selbstverständlich muss dabei die Vitalität der Hefe gewährleistet bleiben. Ist das für den neuen Syntheseweg notwendige Startmolekül nur in geringen Mengen vorhanden, kann das Ausgangsprodukt den Hefezellen auch im Nahrungscocktail zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit, modifizierte Ausgangsprodukte (z.B. halogenierte Vorstufen) in den Stoffwechselweg einfließen zu lassen, um somit zu neuartigen Derivaten zu gelangen.

Da die rein zufällige Zusammensetzung der eYACs auch zur Entstehung von nicht produzierenden Hefezellen führt, müssen in einem geeigneten Selektionsverfahren die relevanten Hefezellen identifiziert werden. Bei der Implementierung von heterologen Biosynthesewegen zur Produktion bekannter Substanzen kann dies über den Einsatz analytischer Chemie erfolgen. Entstandene Zwischen- und Endprodukte werden in qualitativer und quantitativer Weise über LC/MS erfasst und die produktivsten Klone für die weitere Verwendung selektiert. In pharmazeutisch geprägten Projekten kombinieren wir die Biosynthese von Substanzen mit einem High-Throughput-Screening-Verfahren auf ein pharmazeutisch relevantes Zielprotein. Hierzu wird ein Testsystem in den Produktionsstamm eingebaut, das es uns erlaubt, große Hefebibliotheken mit bis zu  $10^9$  unterschiedlichen Hefezellen zu screenen und anschließend die positiven Hefeklone zu isolieren. Auch hier findet die anschließende Isolierung der neuen Verbindung mittels analytischer Chemie statt.

Mit unserer Technologieplattform sind wir bestrebt, die bisher nur unzulänglich ausgeschöpften Möglichkeiten der Biosynthese seltener oder schwierig zu synthetisierender Moleküle in Hefe auszubauen. Die synthetische Biologie, wie wir sie anwenden, bietet die Möglichkeit der Pharma-, Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie eine der klassischen chemischen Synthese nicht zugängliche, neuartige Chemie zur Verfügung zu stellen. Zudem sehen wir ein großes Potential in der Etablierung von neuen, effizienten und gleichzeitig naturnahen, Produktionswegen. Nach unserer Überzeugung ist die von Evolva etablierte Technologie ein Meilenstein auf dem Weg zu einer „grünen Chemie“.

### Literatur

- [1] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG., Science. 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7
- [2] Huang B, Guo J, Yi B, Yu X, Sun L, Chen W, Biotechnol Lett 2008, 30:1121-1137
- [3] Goldman S, Curr Op Chem Biol. 2010, 14:390-395.
- [4] Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourrot S, Dupont C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B., Nat Biotechnol. 2003 Feb;21(2):143-9
- [5] Naesby M, Nielsen SV, Nielsen CA, Green T, Tange TO, Simón E, Knechtle P, Hansson A, Schwab MS, Titiz O, Folly C, Archila RE, Maver M, van Sint Fiet S, Boussemghoune T, Janes M, Kumar AS, Sonkar SP, Mitra PP, Benjamin VA, Korrapati N, Suman I, Hansen EH, Thybo T, Goldsmith N, Sorensen AS., Microb Cell Fact. 2009 Aug 13;8:45

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Jutta Heim  
Evolva SA  
Duggingerstr. 23  
CH-4153 Reinach  
juttah@evolva.com

