

Neue biologische Ansätze für die Synthesechemie

Novel Biological Approaches in Synthesis Chemistry

Martina Geier

Die Pharmaindustrie ist auf der Suche nach nachhaltigen und kostengünstigen Herstellungsverfahren für Medikamente. Im Rahmen des CHEM21-Projekts haben Projektteams an der TU Graz und am Kompetenzzentrum acib gentechnische Werkzeuge entwickelt, um in Zukunft maßgeschneiderte Mikroorganismen für die Arzneimittelproduktion schnell und einfach zur Verfügung zu stellen.

In klassischen Produktionsprozessen werden oftmals bis zu 100 kg an Rohstoffen eingesetzt, um 1 kg an Wirkstoff für Medikamente herzustellen. Diese Ineffizienz stellt nicht nur ein Problem für die Umwelt dar, sondern ist auch maßgeblich für den Preis von Arzneimitteln verantwortlich. Die Knappheit von Edelmetallen wie Platin ist zusätzlich problematisch für die Pharmaindustrie, da diese in vielen Synthesewegen als Katalysatoren eingesetzt werden. Um diese Probleme nachhaltig lösen zu können, braucht es innovative alternative Produktionsmethoden. Das von der EU und von der Innovative Medicines Initiative (IMI) geförderte Projekt CHEM21 arbeitet daran, genau solche neuen Methoden für die Pharmaindustrie des 21. Jahrhunderts zu entwickeln.

CHEM21

Im Rahmen des CHEM21-Projekts haben sich Forschendenteams vom Institut für Molekulare Biotechnologie an der TU Graz sowie vom acib, dem österreichischen Kompetenzzentrum für industrielle Biotechnologie, damit beschäftigt, Konzepte aus der synthetischen Biologie für die Arzneimittelproduktion zu nutzen. Unter synthetischer Biologie, einem relativ jungen Forschungsfeld, versteht man das Konstruieren und Erforschen von nicht-natürlichen biologischen Systemen, um damit unter anderem neue Produkte herzustellen. Eine der ersten umgesetzten Anwendungen und somit auch ein prominentes Beispiel der synthetischen Biologie ist die Herstellung des Malariawirkstoffes Artemisinin in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Entwicklung dieses >

The pharma industry is in search of sustainable and cost-effective manufacturing processes for drugs. In the "CHEM21" project, project teams from TU Graz and acib developed genetic tools to provide tailored microorganisms for quick and straight forward drug production approaches.

Classical drug production processes often require up to 100 kg of raw materials to manufacture 1 kg of the active ingredient of a drug. This inefficiency does not only constitute a problem for the environment, but is also responsible for the price of current medicines. In addition, the scarcity of precious metals such as platinum is an emerging issue in the pharma industry as they are frequently used as catalysts in many of the current synthesis routes. To solve these problems in a sustainable way, innovative alternative production methods are needed. The CHEM21 project funded by the EU and by the Innovative Medicines Initiative (IMI) is focused on the development of exactly such methods for the pharmaceutical industry of the 21st century.

CHEM21

*In the CHEM21 project, research teams from the Institute of Molecular Biotechnology at TU Graz as well as from acib, the Austrian Center for Industrial Biotechnology, have been using concepts from synthetic biology in the production of drugs. Synthetic biology is a relatively young research area and aims to engineer and study non-natural biological systems for new applications, such as getting access to valuable compounds. One of the first realized applications and hence a prominent example for the power of synthetic biology approaches is the production of the anti-malaria drug artemisinin in the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, the development of this yeast strain, which included the implementation of plant-derived biosynthetic pathway steps in the yeast, took several years and required large amounts of research funds. For this reason, one goal of the CHEM21 project was to establish and >*

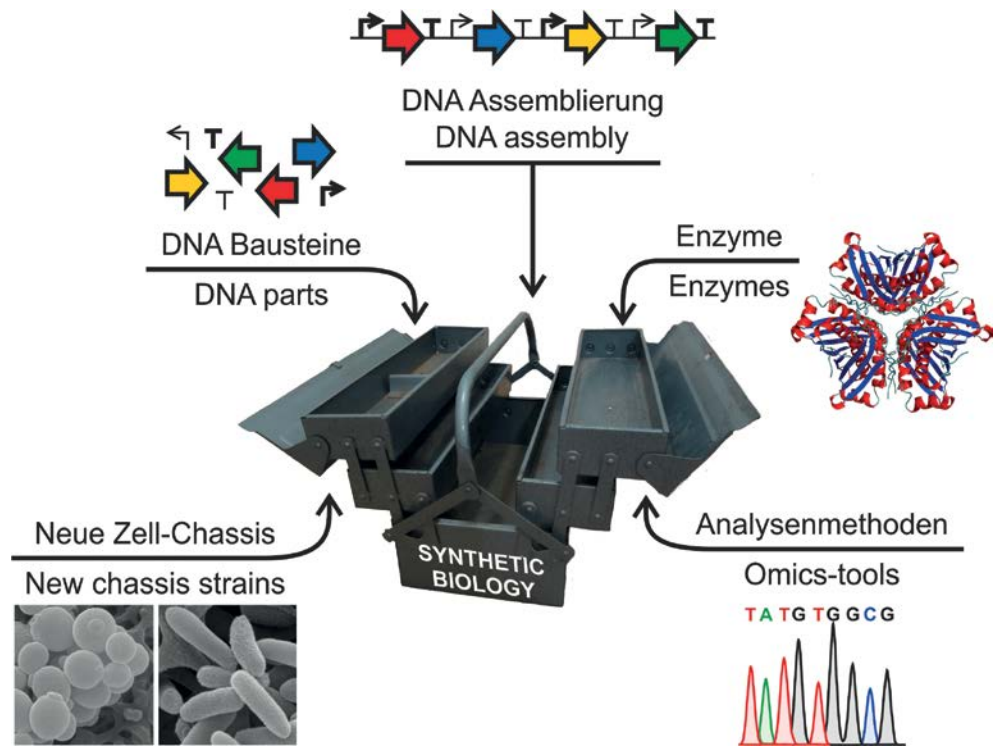


Martina Geier ist Wissenschaftlerin am Austrian Centre of Industrial Biotechnology (acib GmbH). Ihr aktueller Forschungsschwerpunkt liegt auf der Herstellung von „Designer-Hefen“ für neue synthetische Anwendungen.

Martina Geier is a researcher at the Austrian Centre of Industrial Biotechnology (acib GmbH). Her current research focuses on the generation of engineered yeasts for novel synthetic applications.

Abbildung 1:
Die Werkzeugkiste für den synthetischen Biologen.

Figure 1:
The toolbox of the synthetic biologist.



© Bright Wellisch, acib GmbH

Hefestamms, die die Übertragung von pflanzlichen Stoffwechselschritten in die Hefe beinhaltete, nahm mehrere Jahre und große Summen an Forschungsgeldern in Anspruch. Ziel im CHEM21-Projekt war es daher, Methoden zu etablieren und zu evaluieren, wie solche maßgeschneiderten Mikroorganismen in kürzerer Zeit hergestellt werden können. Dabei entstand eine „Werkzeugkiste“ mit komplementären Komponenten, die in Zukunft für die schnelle und einfache Konstruktion von natürlichen oder synthetischen Stoffwechselwegen in Bakterien und Hefen verwendet werden können.

Wichtige Werkzeuge

Stoffwechselwege zu komplexen Molekülen bestehen aus mehreren Reaktionsschritten, die von Enzymen katalysiert werden. Diese Enzyme müssen im Wirtsorganismus in ausreichender und ausbalancierter Menge produziert werden. Daher sind Promotoren – genetische Schalter, die die Produktion von Enzymen regulieren – wichtige Werkzeuge, um hohe Produktausbeuten zu erzielen. Das

evaluate methods to generate such tailored microorganisms in a more straight-forward way in less time. In this process, a “toolbox” with complementary elements was developed that can be used for the quick and simple construction of natural or synthetic pathways in bacteria and yeasts in the future.

Important tools

Pathways for the biosynthesis of complex molecules usually consist of several reaction steps that are catalyzed by enzymes. These enzymes have to be produced in sufficient and balanced amounts in the host system. Therefore, promoters – genetic switches that regulate enzyme production – are important tools to increase the yields of the final product. For the biotechnologically relevant yeast *Pichia pastoris*, the CHEM21 team at the Institute of Molecular Biotechnology identified a set of promoters that vary in strength and regulatory profiles. Consequently, these promoters were used by acib scientists to successfully reconstruct pathways for the production of β -carotene (the orange pigment found e.g. in carrots) and violacein (an antibacterial purple pigment) in the yeast. The resulting colored yeast strains were not only great fun to work with in the lab, but the intensive coloration also indicated high product quantities.

New concept

For the simultaneous production of several enzymes, an alternative approach was tested. In higher organisms, each gene generally requires an individual promoter that drives its expression. This fact can cause problems particularly when large pathways consisting of 10 or more enzymes have to be re-

Abbildung 2:
Im Labor werden die neuesten Ergebnisse besprochen.

Figure 2:
The latest results are discussed in the lab.



© Lukas Sturmberger, acib GmbH

CHEM21-Team am Institut für Molekulare Biotechnologie hat für die biotechnologisch relevante Hefe *Pichia pastoris* ein Set an neuen Promotoren identifiziert, die sich in ihrer Stärke und in ihrem Regulationsprofil unterscheiden. Diese Promotoren wurden von acib-Forschenden in weiterer Folge verwendet, um Stoffwechselwege für die Produktion von β -Carotin (oranger Farbstoff z. B. in Karotten) und Violacein (violette Pigment mit antibakterieller Wirkung) erfolgreich in der Hefe nachzubilden. Die resultierenden bunten Hefestämme sorgten dabei nicht nur für Spaß im Labor, sondern zeigten durch ihre intensive Färbung auch hohe Produktmengen an.

Neues Konzept

Für die simultane Produktion von mehreren Enzymen in Hefen wurde zusätzlich eine alternative Herangehensweise getestet. Normalerweise benötigt man in höheren Organismen für jedes zu produzierende Enzym einen separaten Promotor, der die Expression des zugehörigen Gens steuert. Beim Nachbauen von sehr großen Stoffwechselwegen, die aus zehn oder mehr Enzymen bestehen, kann das zu Problemen führen, z. B. erschwert die Größe des DNA-Konstrukts alle molekularbiologischen Arbeitsschritte. Mehrere Gene können aber auch unter nur einem Promotor exprimiert werden. Diese sogenannte polycistronische Expression kommt in Bakterien natürlich vor, in Hefen kann sie durch den Einsatz von spezifischen DNA-Elementen realisiert werden. Im Rahmen des CHEM21-Projekts konnte gezeigt werden, dass selbstprozessierende 2A-Sequenzen als Werkzeuge für diesen Zweck genutzt werden können. Erstmals wurden neun Gene polycistronisch in *Pichia pastoris* exprimiert und die produzierten neun Enzyme resultierten in funktionellen Stoffwechselwegen.

Weiterer Weg

Die ersten Werkzeuge, darunter auch Assemblierungstechniken sowie modifizierte Plattformstämme mit verbesserten Eigenschaften, die gemeinsam in Graz entwickelt wurden, sind bereits an Projektpartner aus der Pharmabranche weitergegeben worden, wo sie jetzt auf ihre Anwendbarkeit im industriellen Maßstab getestet werden. Es wird sich zeigen, ob einige davon in zukünftigen Produktionsprozessen Anwendung finden und chemische Syntheseschritte ersetzen, um so dem Ziel der nachhaltigen und kostengünstigen Arzneimittelproduktion näherzukommen. Die komplementären Expertisen sowie die gute Vernetzung zwischen dem Institut für Molekulare Biotechnologie und dem acib haben nicht nur zu einem erfolgreichen Abschluss des Projekts geführt, sondern auch die Grundlagen geschaffen, um neue Herausforderungen im Bereich der synthetischen Biologie in Angriff nehmen zu können. ■

*constituted. In many cases, the sheer size of the DNA construct complicates all subsequent molecular biological steps. However, multiple genes can also be expressed using only one promoter. This polycistronic way of expression occurs naturally in bacteria while in yeasts specific DNA elements are required to realize it. It was shown in the CHEM21 project that self-processing 2A sequences constitute efficient tools for this purpose. For the first time, nine enzymes were produced polycistronically in *Pichia pastoris*, which resulted in functional biosynthesis pathways.*



© Brigit Willecht, acib GmbH

Abbildung 3:

Das Einbringen von neuen Stoffwechselwegen führt zu Mikroorganismen mit neuen Eigenschaften, die in Zukunft für die Herstellung von Medikamenten genutzt werden können.

Figure 3:

The implementation of biosynthetic pathways results in microorganisms with new features that can be exploited in the future production of drugs.

Next steps

Some of the synthetic biology tools jointly developed in Graz, among them assembly techniques and modified platform strains with improved properties, have already been transferred to project partners from the pharmaceutical industry to evaluate their applicability on an industrial scale. It remains to be seen whether some of them will find their way into future manufacturing processes. Perhaps they will replace organic synthesis steps and advance the production of sustainable and cost-effective pharmaceuticals. The complementary expertise as well as the high degree of interactions between the Institute of Molecular Biotechnology and acib resulted not only in a successful completion of the project but also built the basis for tackling new challenges in the field of synthetic biology. ■



© Martina Geier, acib GmbH

Abbildung 4:

Bunte Hefestämme, die natürliche Farbstoffe produzieren.

Figure 4:

Colored yeast strains producing natural pigments.