



# SYNMIKRO: Synthetische Mikrobiologie in Marburg

Bruno Eckhardt<sup>1</sup>, Johann Heider<sup>1</sup>, Roland Lill<sup>1</sup>, Anke Becker<sup>1</sup>, Uwe G. Maier<sup>1</sup>, Erhard Bremer<sup>1</sup>, Martin Thanbichler<sup>1,2</sup>, Lotte Sogaard-Andersen<sup>1,2</sup>, Peter Graumann<sup>1</sup>, Peter Lenz<sup>1</sup>, Ekaterina Kostina<sup>1</sup>, Torsten Waldminghaus<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Zentrum für Synthetische Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, <sup>2</sup>Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg

Algen, Bakterien und Pilze stellen den größten Teil der Biomasse und kommen in einer schier unerschöpflichen Zahl und Vielfalt vor. Nur ein Bruchteil von ihnen lässt sich kultivieren und damit in allen Details charakterisieren. Ihr biotechnologisches Potential reicht von der Produktion von Medikamenten bis zur Entsorgung von Plastik oder der Erzeugung von Biosprit. Neue Möglichkeiten eröffnen sich über die gezielte Kombination von Genen verschiedener Organismen, aus der Entwicklung neuer Organismen als Bioreaktoren und durch die Optimierung bekannter Synthesewege. Die interdisziplinär geprägten Forschungsaktivitäten an dem von der Philipps-Universität Marburg und dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie gemeinsam getragenen Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO) reichen von grundlegenden Fragen bis zu biotechnologischen Anwendungen.

Die Chemie-Industrie unternimmt seit Jahren große Anstrengungen, um Grundbausteine und Feinchemikalien auf biotechnologischem Weg zu produzieren. Damit sollen wirtschaftlich alternative Strategien zu bisherigen petrochemischen Rohstoff-Quellen erschlossen und die Stärke der biologischen Verfahren in der Produktion von Stoffen, die für die chemische Synthese schwer zugänglich sind, genutzt werden.

Die klassischen Verfahren für die Biotransformation chemischer Verbindungen nutzen im Wesentlichen Enzyme, die aus Mikroorganismen gereinigt und direkt eingesetzt werden, sowie Mikroorganismen, die Produkte ihres Stoffwechsels in großem Maßstab produzieren. So werden Aminosäuren und Antibiotika ebenso wie Alltagsprodukte wie Alkohol oder Essigsäure gewonnen. Eine wesentliche Idee

der Synthetischen Biologie ist es, die normalen biochemischen Wege von Mikroorganismen durch genetische Manipulation so auszubauen, dass eine Zelle Verbindungen produziert, die sonst nicht oder nur in anderen Lebewesen synthetisiert würden. Gleichzeitig gilt es, die Prozesse so zu optimieren, dass sie für die biotechnologische Produktion relevant werden.

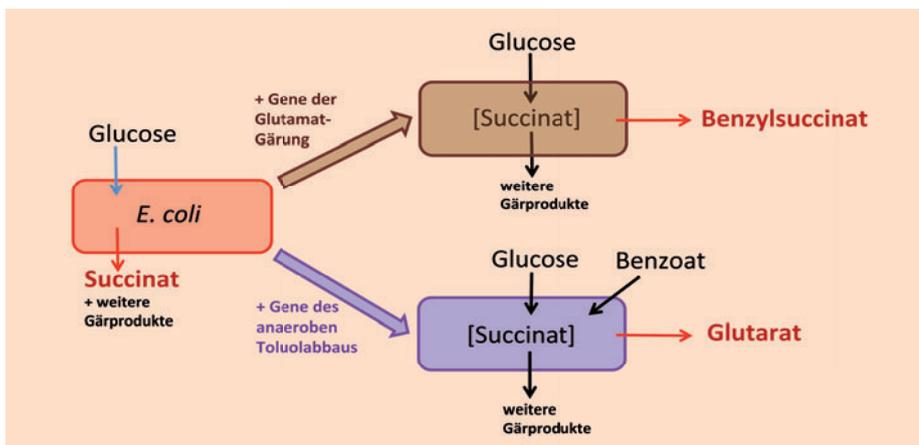
Hier setzt das Zentrum für Synthetische Mikrobiologie SYNMIKRO mit seinen wissenschaftlichen Leitzielen an: Es sollen neue Funktionseinheiten synthetisiert, kombiniert und in den Funktionsapparat der Zelle integriert werden, um Mikroorganismen mit neuen Eigenschaften und Anwendungspotential herzustellen. Zudem sollen unter Einbeziehung von synthetischen und analytischen Forschungsansätzen die bisher statischen Komponenten- und

Funktionsanalysen von mikrobiellen Zellen hin zu einem quantitativen, dynamischen, theoretisch modellierbaren Funktionsverständnis weiterentwickelt werden.

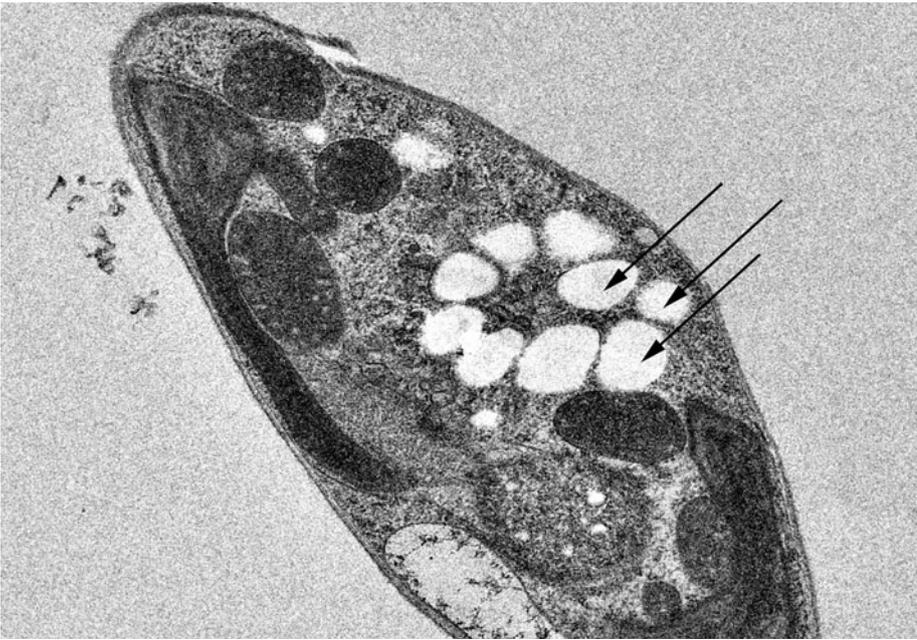
## Synthetische Mikrobiologie für biotechnologische Anwendungen

Succinat, Glutarat und andere Dicarbonsäuren sind äußerst interessante Plattform-Chemikalien, die für die Herstellung biobasierter Kunststoffe eingesetzt werden können. Während das natürliche Gärungsendprodukt Succinat im vorindustriellen Maßstab bereits biologisch hergestellt wird, können andere Dicarbonsäuren bisher nicht biotechnologisch produziert werden, weil im Stoffwechsel der dazu üblicherweise verwendeten aeroben Mikroorganismen die geeigneten Enzyme fehlen. Prinzipiell ist jedoch die biologische Synthese von Glutarat aus Glucose durch die Verwendung von Enzymen aus anaeroben Glutaminsäurefermentierenden Bakterien möglich; allerdings werden diese meist durch Sauerstoff inaktiviert. Deshalb wurde ein anaerober Stoffwechselweg entworfen, mit dem modifizierte *Escherichia coli*-Wirtszellen als „künstliche Anaerobier“ die gewünschte Dicarbonsäure als Gärungsendprodukt herstellen. Kürzlich wurde als erster Schritt tatsächlich die Produktion von kleinen Mengen der Vorläuferverbindung Glutaconat durch entsprechend modifizierte *E. coli*-Zellen nachgewiesen<sup>1</sup>. In ähnlicher Weise sollen auch die stereochemisch definierten Dicarbonsäuren (E)-Phenylitaconat oder (R)-Benzylsuccinat, die chemisch schwierig herzustellen sind und Anwendungspotential als Feinchemikalien und Pharma-Grundstoffe haben, gewonnen werden (Abb. 1). In einem ersten Schritt wurden dazu die Gene für die Aufnahme und Aktivierung der aromatischen Säure Benzoat in Wirtsbakterien eingebracht, die dann Benzoyl-CoA als aktiviertes Starter-Substrat für weitere biosynthetische Reaktionen bereitstellen. Über den normalen Gärungsweg von *E. coli* soll dann das endogene Endprodukt Succinat hergestellt werden, das schließlich durch die eingeschleusten Enzyme des anaeroben Toluolabbaus mit zugefüttertem Benzoat zu Benzylsuccinat als neuem Gärungsendprodukt umgesetzt würde. Insgesamt stellen die künstlichen Anaerobier einen neuen Typ industrieller Mikroorganismen dar, der in den Ansätzen der synthetischen Mikrobiologie bisher unterrepräsentiert ist. Die Schaffung synthetischer anaerober Gärungswege ist sehr vielversprechend und führt das uralte Prinzip der biotechnologischen Nutzung von Gärungsprozessen, wie es bereits hinter der alkoholischen oder der Milchsäuregärung steckt, mit neuen Methoden weiter.

In synthetischen Ansätzen zur Herstellung von Biomolekülen wie iso-Butanol oder Isoprenderivaten, die als vielseitige Ausgangsstoffe für Medikamente, Kosmetika und Feinchemikalien dienen, zeigt sich die Verfügbarkeit



**Abb. 1:** Biotechnologische Produktion von Dicarbonsäuren als Gärungsprodukte. Der Verlauf der normalen gemischten Säure-Gärung von *E. coli* (rot) wird bereits für die Produktion von Succinat manipuliert. Durch das Einschleusen von zusätzlichen Genen der Glutamat-Gärung (braun) oder des anaeroben Toluolabbaus (violett) soll der Gärungsweg nun dahingehend verändert werden, dass anstelle von Succinat die Produkte Glutarat oder Benzylsuccinat produziert werden.



**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kieselalge *Phaeodactylum tricoratum*, welche durch genetische Manipulation das Bioplastik PHB (Poly-3-hydroxybutyrat) in großen Mengen produzieren kann. Das PHB akkumuliert in Granula-artigen Strukturen im Cytosol der Zelle, (Pfeile).

von Eisen-Schwefel-Clustern als limitierendes Element. Den Clustern kommt als Co-Faktoren eine zentrale Bedeutung bei der Synthese von DNA, der Modifikation von Nucleinsäuren, der Umsetzung von Aminosäuren und Metaboliten, oder der Übertragung von Elektronen bei biochemischen Reaktionen zu<sup>2</sup>. Meist werden für die gezielte Synthese der gewünschten Moleküle in Bakterien oder Hefen neue Reaktionswege konstruiert. Die Erfahrung hat allerdings gezeigt, dass die Assemblierung der wirtsfremden Eisen-Schwefel-Proteine häufig ineffizient verläuft und eine höhere Aktivität der Fremdproteine nur über ein besseres Verständnis der Assemblierungsprozesse zu erreichen ist.

Isogene bakterielle Populationen neigen zur Heterogenität im Phänotyp, wodurch die biotechnologische Ausbeute der gewünschten Produkte stark beeinflusst wird. So zeigen Kulturen von Exopolysaccharid-produzierenden Zellen während des Kulturverlaufs eine Aufspaltung in Subpopulationen stark produzierender Zellen und solche, die wenig oder gar kein Exopolysaccharid produzieren. Am Beispiel des symbiotischen Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* wurde gezeigt, wie eine dichteabhängige Autoinduktion durch ein Quorum-Sensing-System aus einer Autoinduktorsynthese und zwei regulatorischen Proteinen diese Aufspaltung kontrolliert<sup>3</sup>. Mit diesem detaillierten Modell und Prozessverständnis eröffnen sich Möglichkeiten, die phänotypische Heterogenität in isogenen bakteriellen Produktionskulturen zu reduzieren.

Neue Potentiale für eine umweltfreundliche Produktion ergeben sich durch den Wechsel der Wirtsorganismen. Diatomeen (Kieselalgen) lassen sich einfach kultivieren, können CO<sub>2</sub>-freie

Synthesen durchführen und gewinnen die erforderliche Energie kostengünstig aus dem Sonnenlicht<sup>4</sup>. Die biotechnologischen Verfahren sind bereits so weit fortgeschritten, dass Spinnseide, Bioplastik (Abb. 2) sowie ein Antikörper und ein potentieller Impfstoff mit zum Teil sehr hohen Ausbeuten biotechnologisch hergestellt werden können.

### Interdisziplinäre Ansätze zur Untersuchung zellulärer Organisation

Die synthetische Mikrobiologie strebt die Entwicklung frei kombinierbarer und modularer Einheiten an, sogenannter Biobricks. Neben den kleineren, im vorherigen Abschnitt beschriebenen biochemischen Reaktionspfaden werden dabei auch größere Module, etwa zur Stressresistenz oder zur Zellteilung, angestrebt. Voraussetzung für die erfolgreiche Implementierung derartiger Biobricks ist allerdings das Verständnis grundlegender Mechanismen zellulärer Organisation in Mikroorganismen. Hier kommt mit der interdisziplinären Zusammenarbeit von Mikrobiologen mit Physikern, Mathematikern und Informatikern eine der Stärken von SYNMIKRO zum Tragen. Gerade die räumliche Position makromolekularer Strukturen innerhalb der Zelle wirft viele spannende Fragen auf. Exemplarisch stehen dafür die Untersuchungen eines regulatorischen Netzwerkes, das im Bakterium *Caulobacter crescentus* für die korrekte Platzierung des Zellteilungsapparats verantwortlich ist<sup>5</sup>. Neben einer detaillierten zellbiologischen und biochemischen Analyse der beteiligten Komponenten wird eine *in silico*-Modellierung des Systems angestrebt, um das komplexe

Netzwerk an raum- und zeitabhängigen Interaktionen zwischen den beteiligten Komponenten zu verstehen. Auf der Grundlage des erhaltenen Modells können anschließend die Eigenschaften des regulatorischen Netzwerkes gezielt verändert und die Voraussetzungen für eine Adaption an neue zelluläre Umgebungen abgeleitet werden.

Die Bewegung von Bakterien und insbesondere die Richtungswechsel erfordern einen Taktgeber, der unabhängig vom Zellzyklus ist<sup>6</sup>. Wie am Beispiel der Mobilitätsproteine des Bakteriums *Myxococcus xanthus* gezeigt werden konnte, stehen die Richtungswechsel im Zusammenhang mit unregelmäßigen Oszillationen zwischen den Zellpolen. Zusammen mit theoretisch arbeitenden Gruppen aus der Physik und Mathematik wird derzeit untersucht, welche minimalen Bestandteile erforderlich sind, um diese räumlichen Oszillationen zu ermöglichen. Parallel dazu werden die beteiligten molekularen Spieler experimentell bestimmt.

Doch auch diese aufwändigen Modifikationen einer Zelle sind nur ein Schritt auf dem Weg zu dem ultimativen Ziel, das mit der Synthese von *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 vorgezeichnet wurde<sup>7</sup>: der vollständigen Herstellung eines neuen Organismus aus frei kombinierbaren genetischen Modulen. Die Möglichkeit, über eine vollständige chemische Synthese komplette synthetische Chromosomen herzustellen erlaubt gezielte Untersuchungen, welche Komponenten für welche Funktionen gebraucht werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse werden helfen zu verstehen, was ein Chromosom zu einem Chromosom macht.

### Literatur

- [1] Djurdjevic, I., Zelder, O., Buckel, W., Appl Environ Microbiol. 77 (2011), 320 - 332.
- [2] Lill, R., Nature 460 (2009), 831 - 838.
- [3] McIntosh, M., Meyer, S., Becker, A., Mol. Microbiol. 74 (2009), 1238 - 1256.
- [4] Hempel, F., Bozarth, A.S., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A., Maier, U.G., Microbial Cell Factories 10 (2011) (online first).
- [5] Thanbichler, M., Shapiro, L., Cell 126 (2006), 147-162.
- [6] Lenz, P., Sogaard-Andersen, L., Nature Reviews Microbiol. 9 (2011), 565 - 577.
- [7] Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Young, L., Qi, Z.Q., Segall-Shapiro, T.H., Calvey, C.H., Parmar, P.P., Hutchison, C.A. 3rd, Smith, H.O., Venter, J.C., Science 329 (2010), 52 - 56.

Das Zentrum für Synthetische Mikrobiologie wird vom Land Hessen im Rahmen der Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) gefördert.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Bruno Eckhardt  
LOEWE-Zentrum f. Synthetische Mikrobiologie  
Hans Meerwein-Straße, MZVG, 35032 Marburg  
Tel./Fax.: +49 (0)6421-28-24401/ -28-24430  
Bruno.eckhardt@synmikro.uni-