

## Komplexe *in vitro*-Systeme

# Multienzymnetzwerke für die Feinchemie

MATTHIAS BUJARA, SONJA BILLERBECK, SVEN PANKE  
BIOPROZESSLABOR, DEPARTMENT FÜR BIOSYSTEME, ETH ZÜRICH, BASEL, SCHWEIZ

**Die Produktion von Feinchemikalien beruht auf Prozessen mit mehreren Reaktionsschritten. Wir arbeiten an Konzepten für die Rekrutierung, Isolierung und Optimierung von *in vitro*-Enzymkaskaden aus Zellextrakten für die Synthese von komplexen Zuckern.**

The production of fine chemicals relies on complex multi-step synthesis. We work on the scientific and technical challenges to recruit, insulate and optimize multi-enzyme *in vitro* networks from cell free extracts for the synthesis of complex sugars.

■ In der Weißen Biotechnologie, der Produktion von Grund- und Feinchemikalien mithilfe von Biokatalysatoren, haben sich die Produktion durch Kultivierung lebender Zellen und die Biokatalyse in zellfreien Systemen oder durch einzelne gereinigte Enzyme etabliert. Während in zellulären Systemen in der Regel komplexe metabolische Reaktionsnetzwerke nutzbar gemacht werden können, beruht die Produktion in zellfreien Systemen typischerweise nur auf wenigen Reaktionen, zumeist gar nur auf einer. Aus unserer Sicht wird die Ausdehnung der Biokatalyse auf komplexe *in vitro*-Enzymnetzwerke durch zwei Dinge limitiert: Das Zusammenstellen der Enzymnetzwerke ist gegenwärtig aufwendig, und die vielfältigen Interaktionen zwischen den Enzymen, den chemischen Zwischenprodukten und Elementen des zellfreien Extrakts verhindern einen effizienten Betrieb des Netzwerks. Wir arbeiten an Methoden, ein isoliertes und dynamisch optimiertes Enzymnetzwerk aus dem zellfreien Extrakt einer einzigen Kultivierung zu rekrutieren.

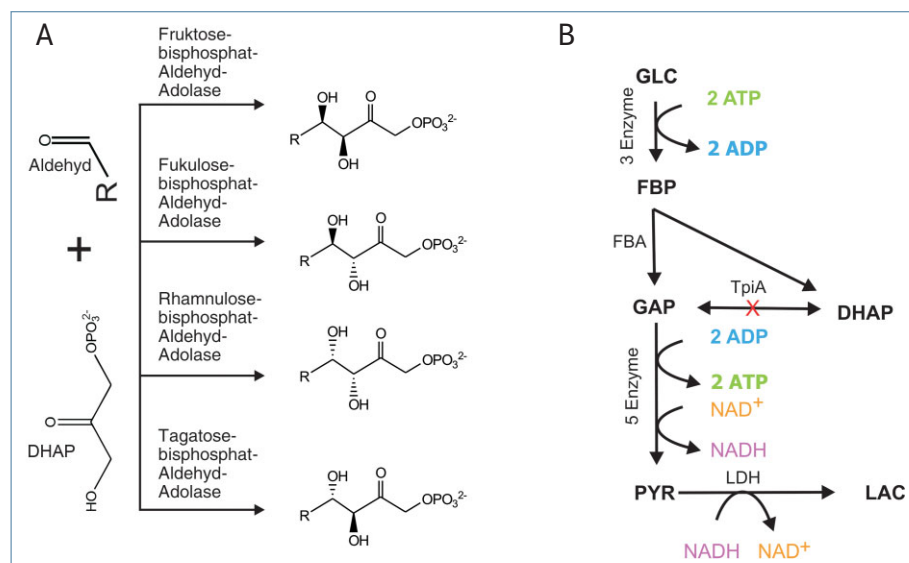
Komplexe, zellfreie Systeme finden unter anderem Anwendung in der zellfreien Proteinsynthese [1], der Produktion von Biowasserstoff aus Zuckern [2] und der Produktion von Feinchemikalien [3, 4]. Biokatalytische Multienzymsynthesen haben traditionell in der organischen Chemie, insbesondere im Bereich der Zuckersynthese, Eingang

gefunden. Zucker gehören zu den komplexesten Biomolekülen und sind aufgrund dessen nur sehr aufwendig auf chemischem Weg zu synthetisieren. Enzyme sind typischerweise spezifisch für eine Stereokonfiguration, und unterschiedliche Stereokonfigurationen können durch den Einsatz unterschiedlicher Enzyme realisiert werden. Ein viel zitiertes

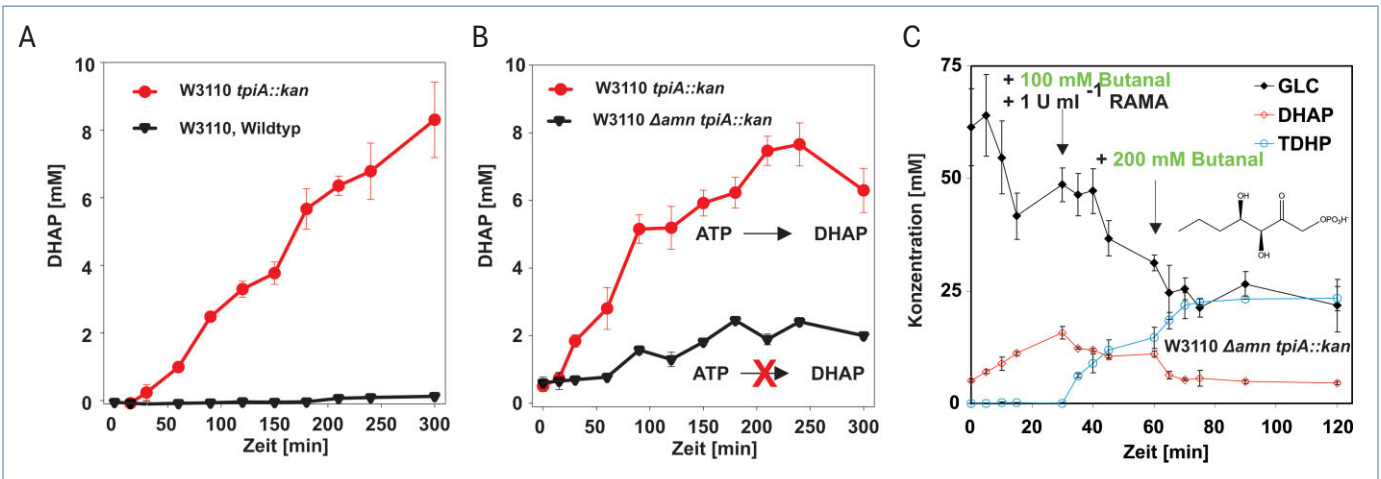
Beispiel ist die selektive Synthese der vier möglichen Stereoisomere eines vicinalen Diols durch Dihydroxyacetonphosphat-(DHAP)-abhängige Aldolasen. Es gibt ein theoretisch vollständiges Set von DHAP-abhängigen Aldolasen, welche eine C-C-Bindung zwischen DHAP und einem Aldehyd in den vier möglichen Konformationen kondensieren und darüber hinaus ein weites Spektrum an Aldehyden akzeptieren (Abb. 1A, [5]). Dieses Potenzial wurde bislang nur wenig genutzt, da DHAP ein essenzielles Substrat ist, das gegenwärtig nur sehr eingeschränkt herzustellen ist [6]. Um DHAP-abhängige Aldolasen im großen Maßstab nutzen zu können, ist es daher erforderlich, einen einfachen und günstigen Weg für die Synthese von DHAP zu finden [7].

### DHAP-Produktion durch *in vitro*-Glykolyse

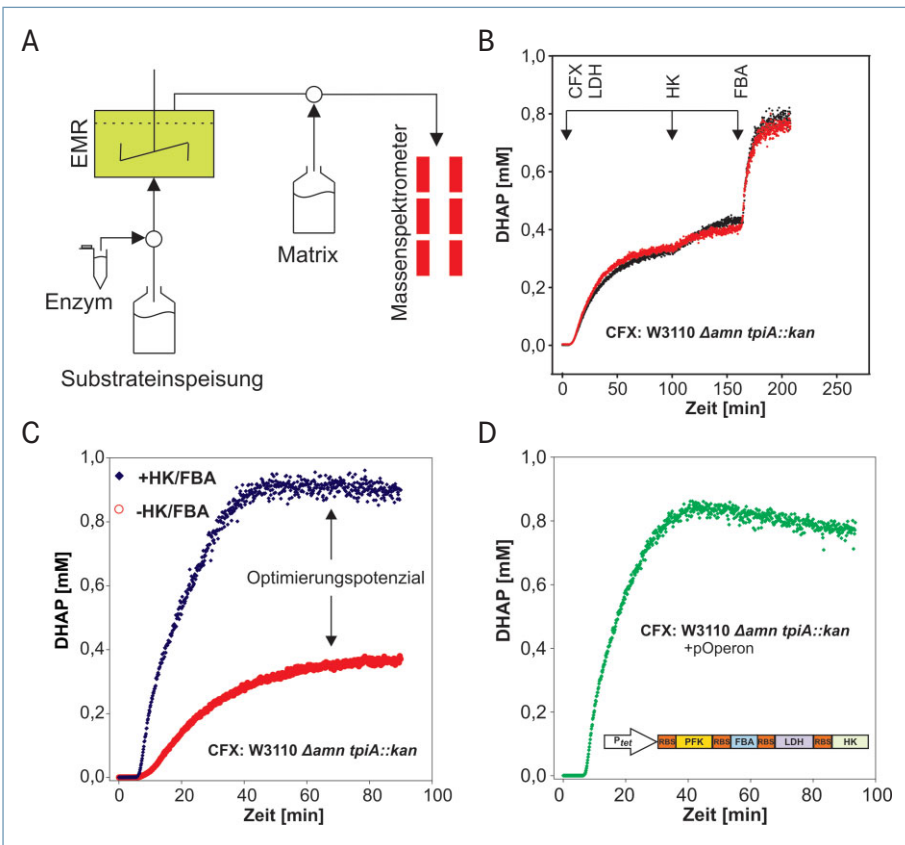
DHAP ist ein Intermediat der Glykolyse ausgehend von Glukose (GLC) und entsteht durch



▲ **Abb. 1:** Herstellung von DHAP für die Zuckerproduktion. **A,** Kombinatorische Synthese vicinaler Diole ausgehend von DHAP mit einem stereochemisch vollständigen Satz an DHAP-abhängigen Aldolasen. **B,** Glykolyse-basiertes DHAP-Produktionsnetzwerk mit integrierter Kofaktorregeneration. FBA, Fruktosebisphosphat-Aldolase; TpiA, Triosephosphatisomerase; LDH, Laktatdehydrogenase; GLC, Glukose; FBP, Fruktosebisphosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-phosphat; PYR, Pyruvat; LAC, Laktat (weitere Erklärungen im Text).



▲ **Abb. 2:** Produktion von DHAP in einem zellfreien Extrakt von *Escherichia coli*. **A**, Die Deletion des *tpiA*-Gens erlaubt die Akkumulation von DHAP aus Glukose. **B**, Stabilisierung des Kofaktors ATP durch Deletion des Gens für die AMP-Nukleosidase (*amn*). Das Experiment wurde ohne Zugabe von Glukose durchgeführt, aber mit einer hohen ATP-Konzentration (23 mM). **C**, Produktion von 5,6,7-Trideoxy-D-threoheptulose-1-phosphat (TDHP) aus Glukose (GLC) mittels glykolytischer DHAP-Produktion und Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA).



▲ **Abb. 3:** Optimierung der DHAP-Produktion mithilfe eines Echtzeitanalysesystems. **A**, Echtzeitanalysesystem zur Analyse von metabolischen *in vitro*-Netzwerken. Der Ausfluss eines Enzymmembranreaktors (EMR) wird kontinuierlich in einem Massenspektrometer analysiert. **B**, Die Reaktionen der Hexokinase (HK) und Fruktosebisphosphat-Aldolase (FBA) limitieren die DHAP-Produktion in einem kontinuierlichen System. Aufgereinigte, kommerziell erhältliche HK (aus Hefe) und FBA (aus Kaninchenmuskel) wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten zugegeben. **C**, Optimierungspotenzial für die kontinuierliche DHAP-Produktion durch Erhöhung der HK- und FBA-Aktivitäten. Rot: ohne Enzymzugabe, blau: mit Zugabe von HK und FBA. **D**, Implementierung eines Operons steigert die DHAP-Produktion im selben Maße wie die Zugabe von gereinigten Enzymen und macht das Produktionssystem unabhängig von der Zugabe. LDH, Laktatdehydrogenase; PFK, Phosphofruktokinase; CFX, zellfreies Extrakt.

die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) in DHAP und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) (**Abb. 1B**). Durch Ausschalten der Triosephosphatisomerase (TpiA) kann DHAP akkumulieren, während der ATP-Bedarf des Systems theoretisch durch kontinuierliche ATP-Regeneration im unteren Teil der Glykolyse gedeckt wird. Wenn man nun zellfreien Extrakt eines *Escherichia coli*-Stamms einsetzt, dem die TpiA-Aktivität entfernt wurde, so akkumuliert in Batch-Reaktionen DHAP (**Abb. 2A**, [4]). Dieses System erfordert allerdings hohe Konzentrationen an ATP, um Glukose vollständig zu DHAP umzusetzen. Der Grund dafür ist das Vorhandensein von Enzymen im zellfreien Extrakt, die ATP (oder auch ADP oder AMP) als Substrat verwenden, aber nicht zur Produktion von DHAP beitragen. ATP kann sogar über AMP anstelle von Glukose als Substrat für die DHAP-Produktion genutzt werden, wodurch der AXP-Spiegel (AXP: Summe aus ATP, ADP und AMP) abnimmt (**Abb. 2B**). Als ersten Schritt in der Optimierung des Systems wurde der AXP-Spiegel stabilisiert, indem das Gen für die AMP-Nukleosidase (*amn*), die AMP zu Adenin und Ribose-5-phosphat hydrolysiert, entfernt wurde. Dies erlaubte außerdem eine Reduktion der ATP-Zugabe um 75 Prozent [4].

Aufgrund seiner mangelnden Stabilität ist DHAP kein geeignetes Endprodukt einer Reaktionskaskade, sondern besser ein Substrat für die kombinatorische Synthese von unnatürlichen Zuckern. Die exemplarische Synthese von 5,6,7-Trideoxy-D-threoheptulose-1-phosphat (TDHP) mit dem zellfreien Extrakt der *tpiA-amn*-Doppelmutante zeigt,

dass dies prinzipiell möglich ist. Als Aldehyd wurde Butanal hinzugegeben. Da die endogene *E. coli*-Aldolase fast ausschließlich GAP als Aldehyd akzeptiert, wurde eine kommerziell erhältliche Aldolase aus dem Kaninchenmuskel hinzugegeben, die bekannt für ihre Akzeptanz einer breiten Palette von Aldehyden ist. Mit diesem System konnten ca. 40 Prozent der bereitgestellten Glukose zu TDHP umgesetzt werden (**Abb. 2C**).

### Optimierung durch Echtzeitanalyse

Weiterhin sollte die Produktionsrate des Systems, also die zehn Reaktionen von Glukose zu Laktat und DHAP, optimiert werden. Um Rückschlüsse auf potenziell limitierende Reaktionen ziehen zu können, müssen möglichst alle Metaboliten gemessen werden. Die Analyse von glykolytischen Metaboliten mittels Chromatografie und Massenspektrometrie stellt allerdings nach wie vor einen erheblichen Zeitaufwand dar. Um diesen Engpass zu überwinden, haben wir ein Messsystem entwickelt, das eine Echtzeitaufnahme von 15 Metabolitkonzentrationen mit einer Zeitauflösung von einer vollständigen Messung alle acht Sekunden erlaubt [8]. Das System basiert auf einem als Chemostat betriebenen Enzymmembranreaktor (EMR), bei dem der Ausfluss nach nur einem Verdünnungsschritt kontinuierlich in einem Massenspektrometer analysiert wird (**Abb. 3A**). Durch die Membran werden die Enzyme im Reaktorinneren zurückgehalten, während die Metaboliten passieren können. Durch den Echtzeitcharakter der Methode lässt sich das Verhalten von Metaboliten nach einer Störung, wie beispielsweise der Zugabe von einem Enzym oder einem Metabolit, online verfolgen und so quasi Online-Optimierung von Stoffwechselwegen betreiben.

Diese Analysemethode erlaubte es uns, limitierende Reaktionen in unserem Produktionsnetzwerk zu finden, indem kommerziell erhältliche, gereinigte Enzyme in den Reaktor injiziert wurden, nachdem die DHAP-Konzentration einen stationären Zustand erreicht hatte. So wurde eine kooperative Limitation in den Reaktionen der Hexokinase (HK) und der Fruktosebisphosphat-Aldolase (FBA) gefunden (**Abb. 3B, C**). Zur Kompensation dieses Flaschenhalses wurden die korrespondierenden endogenen *E. coli*-Gene in ein synthetisches Operon kloniert. Da eine feine Abstimmung der Enzymaktivitäten – insbesondere der Hexokinase – notwendig ist und eine Vorhersage von intrazellulären Enzymaktivitäten auf Basis von DNA-Sequenzen

noch nicht möglich ist, mussten drei verschiedene Varianten des Operons mit verschiedener Reihenfolge der Gene und unterschiedlicher Gendosierung getestet werden. Dieser Prozess der Optimierung wurde durch die Online-Analyse erheblich vereinfacht, da in einem einzigen Experiment noch bestehende oder neu entstandene Limitationen identifiziert werden konnten [8]. Das endgültige Operon bestand aus vier Genen und erlaubte die verbesserte DHAP-Produktion ohne Zusatz von aufgereinigten Enzymen (**Abb. 3D**).

Die Entwicklung von neuen Methoden für die Isolierung und Optimierung von zellfreien Systemen sollten zukünftig die zuverlässige Rekrutierung von komplexeren Netzwerkstrukturen für die Biokatalyse ermöglichen, ohne auf teure und zeitintensive Enzymreinigung angewiesen zu sein. So sollten neue, ökonomische Multienzymsynthesen schnell Einzug in die feinchemische Synthese finden. Im Zuge dessen wird der „Systemcharakter“ in der Biokatalyse an Bedeutung gewinnen und letztlich stark auf die Methoden des *Metabolic Engineering* für lebende Systeme zurückgreifen.

### Danksagung

Wir sind insbesondere Michael Schümperli, Rene Pellaux und Matthias Heinemann für ihre Hilfe bei der Implementierung der Multienzymsysteme und der Echtzeitanalysen zu Dank verpflichtet, außerdem Uwe Sauer und Nicola Zamboni von der ETH Zürich und Christian Wandrey und Marco Oldiges vom Forschungszentrum Jülich für ihre Hilfe bei der Etablierung der MS-Analyse. ■

### Literatur

- [1] Stapleton JA, Swartz JR (2010) A cell-free microtiter plate screen for improved [FeFe] hydrogenases. *PLoS ONE* 5:e10554
- [2] Zhang YHP, Evans BR, Mielenz JR et al. (2007) High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. *PLoS ONE* 2:e456
- [3] Zhang YHP (2010) Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities. *Biotechnol Bioeng* 105:663–677
- [4] Bujara M, Schümperli M, Billerbeck S et al. (2010) Exploiting cell-free systems: implementation and debugging of a system of biotransformations. *Biotechnol Bioeng* 106:376–389
- [5] Dean SM, Greenberg WA, Wong C-H (2007) Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis. *Adv Synth Catal* 349:1308–1320
- [6] Schümperli M, Pellaux R, Panke S (2007) Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:33–45
- [7] Herk T v, Hartog AF, Babich L et al. (2009) Improvement of an acid phosphatase/DHAP-dependent aldolase cascade reaction by using directed evolution. *ChemBioChem* 10:2230–2235
- [8] Bujara M, Schümperli M, Pellaux R et al. (2011) Optimization of a blueprint for in vitro glycolysis by metabolic real-time analysis. *Nat Chem Biol* 7:271–277

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Sven Panke  
Department of Biosystems Science and Engineering  
ETH Zürich  
Mattenstraße 26  
CH-4058 Basel  
Tel.: +41-(0)61-387-3209  
Fax: +41-(0)61-387-3994  
sven.panke@bsse.ethz.ch

### AUTOREN



#### Matthias Bujara

Jahrgang 1980. 2001–2007 Biotechnologiestudium an der TU Braunschweig; Diplomarbeit in Infektionsbiologie. 2005–2006 Austausch und Studienarbeit an der University of Waterloo, Kanada. 2007 Onkologische Forschung, Nycomed GmbH, Konstanz. Seit 2007 Doktorand am Bioprozesslabor ETH Zürich, Schweiz.



#### Sonja Billerbeck

Jahrgang 1982. 2001–2007 Biologiestudium an der Universität Tübingen. Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen. 2004–2005 Studium an der Universidade de São Paulo, Riberão Preto, Brasilien. Seit 2008 Doktorandin am Bioprozesslabor ETH Zürich, Schweiz.



#### Sven Panke

Jahrgang 1967. 1989–1995 Biotechnologiestudium in Braunschweig und Madrid, Spanien. 1995–1999 Promotion an der ETH Zürich, Schweiz. 1999–2001 Wissenschaftler bei DSM Research, Geleen, Niederlande. Seit 2001 Assistenz- und außerordentlicher Professor für Bioverfahrenstechnik an der ETH Zürich.