

Hefe *Saccharomyces cerevisiae* – Mikrobe des Jahres 2022

Maßgeschneiderte Hefezellen für biotechnologische Anwendungen

MISLAV OREB, JOANNA TRIPP

INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

The tremendous body of knowledge about genetics, cell biology, and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, as well as its long history and robustness in industrial fermentations, have made this yeast one of the most popular microbial cell factories. Novel genetic tools have enabled the rapid construction of strains producing various platform chemicals, fuels, or pharmaceuticals. The relevance of synthetic biology approaches, such as the construction of fully synthetic genomes and artificial cellular compartments are not only relevant for biotechnological applications but can also lead to new insight into basic principles of life.

DOI: 10.1007/s12268-022-1704-y

© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dient den Menschen schon lange. Zudem ist sie unempfindlich gegenüber industriellen Prozessbedingungen. Dank der Wissensfülle über ihre Genetik, Biochemie und Zellbiologie (siehe Artikel von Westermann und Klecker, S. 11) wird sie nach der Erfindung der rekombinanten DNA-Technologie erfolg-

reich in der modernen Biotechnologie eingesetzt.

Von ihr profitieren beispielsweise Diabetiker seit Jahrzehnten: In das Hefegenom wurde das menschliche Insulingen „eingepflanzt“, sodass dieser winzige Organismus einen Großteil des menschlichen Hormons für die Therapie von Diabetes produziert.

Durch enorme Fortschritte der Gentechnik und Genomik während der letzten Jahre haben sich neue Forschungsdisziplinen entwickelt, die über das Einbringen einzelner Gene hinausgehen: Metabolic Engineering und Synthetische Biologie streben eine systemweite Umgestaltung der Zellphysiologie an, etwa um Chemikalien von industrieller Bedeutung effizienter und umweltfreundlicher herstellen zu können als das mit konventionellen Methoden möglich ist.

Neue gentechnische Werkzeuge und synthetische Hefegenome

S. cerevisiae ist für genetische Modifikationen besonders leicht zugänglich. Das ist der Tatsache geschuldet, dass ein DNA-Reparaturmechanismus, die homologe Rekombination, in dieser Hefe besonders effizient ist. Durch homologe Rekombination kann prinzipiell an beliebiger Stelle im Hefegenom ein DNA-Fragment eingefügt werden, wenn es von relativ kurzen Sequenzen flankiert wird, die mit Abschnitten an der Einbaustelle übereinstimmen. Auf diese Weise können Gene eingefügt, ausgetauscht oder ausgeschaltet werden. Diese Methode wird seit Jahrzehnten benutzt; sie ermöglichte u. a. die Konstruktion von Stammsammlungen, die für die Grundlagenforschung von unschätzbarem Wert sind.

Die CRISPR-Technologie erweiterte die Möglichkeiten der Gentechnik enorm [1]. Mithilfe dieser „Genschere“ kann ein DNA-Doppelstrang an beliebiger Stelle in einem Genom präzise geschnitten werden. Dann kommt wieder die homologe Rekombination ins Spiel: Die Zelle benutzt homologe Sequenzen, um den „Schnitt“ in ihrer DNA zu schließen – und Forscher können dies nutzen, um dabei Sequenzen ihrer Wahl einzuschleusen. Im Unterschied zur einfachen homologen Rekombination können jetzt mehrere Genkassetten wie eine Kette gleichzeitig eingeführt werden. Für ihre Anzahl scheint es bis dato keine Obergrenze zu geben. Zudem ermöglicht CRISPR Modifikationen an mehreren Stellen im Genom gleichzeitig, was mit traditionellen Methoden unmöglich oder bestenfalls sehr ineffizient war.



▲ **Abb. 1:** Eine Industrieanlage für die Produktion von Bioethanol der zweiten Generation. In dieser Anlage wird Ethanol mithilfe von Hefe aus Lignocellulose, etwa aus Stroh, produziert. Foto: Clariant.

Beschleunigte Evolution im Reagenzglas

Doch die Ambitionen der synthetischen Biologie enden nicht mit der Modifikation eines bestehenden Genoms. Das von Jef Boeke (Johns-Hopkins-Universität) geleitete Sc2.0-Projekt hat sich zum Ziel gesetzt, in *S. cerevisiae* das erste synthetische Genom einer höheren (eukaryotischen) Zelle zu konstruieren. Die 16 natürlichen Chromosomen der Hefe sollen dabei durch im Reagenzglas hergestellte Gegenstücke ersetzt werden [2]. Es handelt sich hierbei nicht um synthetische Kopien der Hefechromosomen; vielmehr wurden bestimmte Designprinzipien angewandt, um das Genom kleiner (um ca. 8 %) und für künftige Anwendungen leichter zugänglich zu machen. So wurden z. B. Elemente ohne funktionelle Bedeutung für die Zellphysiologie, wie Transposons (bei denen es sich um evolutionäre Relikte vergangener Virusinfektionen handelt), weggelassen. Andererseits wurden an zahlreichen Stellen kurze Sequenzabschnitte eingebaut, die als Hotspots für homologe Rekombination die-

nen, wenn ein molekularer Schalter aktiviert wird (SCRaMbLE-Methode). Dies ermöglicht eine Neuordnung der Gene innerhalb des Genoms in unzähligen Varianten, die nachfolgend auf der Basis ihrer Fitness unter verschiedenen Bedingungen selektiert werden können. Man könnte das Prinzip als eine beschleunigte Evolution im Reagenzglas beschreiben.

Nachdem 2011 das erste synthetische Chromosom in die Hefezellen eingepflanzt wurde, machte das Projekt rasante Fortschritte, und nun steht „*Saccharomyces cerevisiae* 2.0“ kurz vor seiner Vollendung. Davon erhofft sich die Wissenschaft nicht nur eine handliche Plattform für biotechnologische Anwendungen, sondern auch einen Erkenntnisgewinn über die Prinzipien, die der Architektur eines eukaryotischen Genoms zugrunde liegen.

Umgestaltung des Hefestoffwechsels für biobasierte Chemikalien

Natürlicherweise vergärt *S. cerevisiae* vor allem die Hexosezucker Glucose und Fructo-

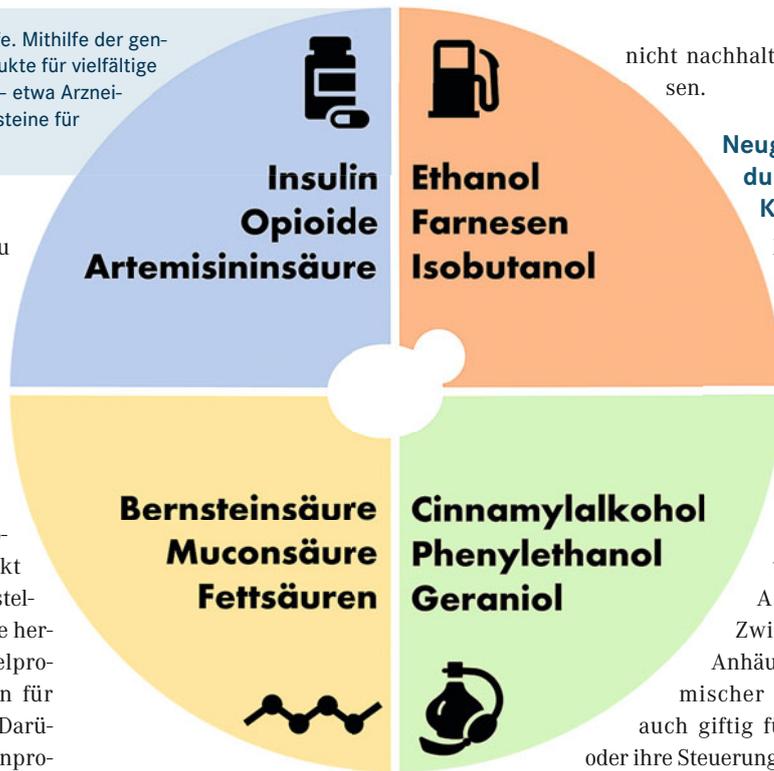
se zu Ethanol (siehe auch Beitrag von Westermann und Klecker, S. 11). Diese Eigenschaft wird nicht nur für die Produktion von alkoholischen Getränken, sondern seit langem auch für die großtechnische Herstellung von Ethanol als wichtige Chemikalie oder als Biokraftstoff genutzt.

Da Glucose und Fructose vor allem aus Nahrungspflanzen wie Mais oder Zuckerrohr gewonnen werden, führt diese traditionelle Produktion zu einem „Tank-oder-Teller“-Dilemma. Einen Ausweg bietet Metabolic Engineering, eine wissenschaftliche Disziplin, die sich mit der Umgestaltung des Stoffwechsels mithilfe der Gentechnik beschäftigt. Forscherteams konnten durch Einbringen von Genen aus anderen Pilzen oder Bakterien die Hefe in die Lage versetzen, die natürlichen Zucker aus Holz wie Xylose in Ethanol umzuwandeln, sodass nun pflanzliche Abfallstoffe anstelle von Lebensmitteln als Rohstoff dienen können [3]. Eine Industrieanlage, die Ethanol nach diesem Verfahren produziert, zeigt **Abbildung 1**. Die in Podari, Rumänien, gebaute Anlage verarbei-

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer

► **Abb. 2:** Metabolic Engineering von Hefe. Mithilfe der gentechnisch veränderten Hefe können Produkte für vielfältige Anwendungsbereiche produziert werden – etwa Arzneimittel, Kraftstoffe, Aromastoffe oder Bausteine für Polymere. Gezeigt sind einige Beispiele.



nicht nachhaltigen Produktionsweisen.

Neugestaltete Zelle durch synthetische Kompartimente

Metabolic Engineering erfordert häufig eine massive Umleitung des Stoffwechsels, was Folgen für die Zellphysiologie hat. Die gentechnisch eingeführten Enzyme konkurrieren mit zelleigenen Stoffwechselwegen um die Ausgangsstoffe und Zwischenprodukte. Eine Anhäufung bestimmter chemischer Verbindungen kann auch giftig für die Hefezelle sein oder ihre Steuerungssysteme „verwirren“.

tet im Jahr ca. 250.000 Tonnen Stroh zu 50.000 Tonnen Cellulose-Ethanol (Clariant sunliquid®-Technologie).

Für die Erweiterung des Produktspektrums gibt es noch vielfältige Möglichkeiten: Der Stoffwechsel ist vielfach verzweigt, und der Fluss über die einzelnen Verzweigungen lässt sich durch Abschwächen und Verstärken von enzymatischen Reaktionen an jedem einzelnen Knotenpunkt steuern. So lässt sich beispielsweise anstelle von Ethanol vermehrt Bernsteinsäure herstellen, ein gewöhnliches Stoffwechselprodukt, das industriell als ein Baustein für Polyester verwendet werden kann [4]. Darüber hinaus stellen unzählige Zwischenprodukte des Stoffwechsels Ausgangspunkte für neue, in der Hefe nicht vorkommende metabolische Reaktionen dar.

Eine von vielen Erfolgsgeschichten ist die Artemisininsäure, eine Vorstufe des Malaria-wirkstoffs Artemisinin. Sie kann durch eine sehr ausgefeilte „Umleitung“ des Isoprenoid-Biosyntheseweges so effizient produziert werden, dass die Technologie auch den Weg zur industriellen Produktion fand [5]. Sie bietet zudem eine Ausgangsbasis, um weitere, chemisch verwandte Stoffe wie den

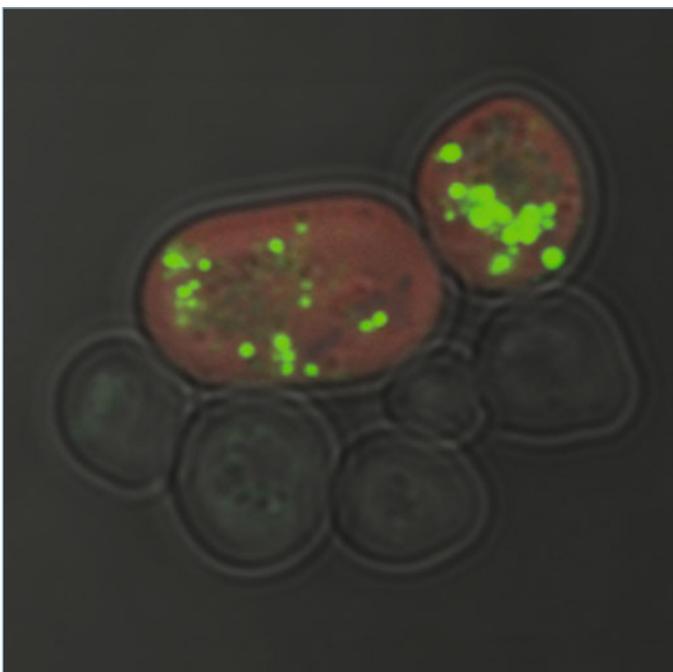
Ersatz-Flugzeugkraftstoff Farnesen herzustellen.

Nach ähnlichen Prinzipien lassen sich mit Hefe viele Arten chemischer Verbindungen wie Fette, Kohlenwasserstoffe, Aromastoffe, Pigmente, Alkaloide oder Flavonoide herstellen [6, 7], die bisher aus Rohöl oder durch eine aufwändige Extraktion aus Pflanzen gewonnen wurden. Einige Beispiele zeigt **Abbildung 2**. Daher bietet Metabolic Engineering einen möglichen Ausweg aus diesen

Manchmal werden aus diesem Grund wichtige Vorstufenmoleküle aus der Zelle ausgeschleust, was wiederum eine niedrigere Ausbeute der gewünschten Produkte zur Folge hat.

Auch zwischen den in der Zelle natürlich vorkommenden Stoffwechselwegen kann es zu unvorteilhaften Wechselwirkungen kommen, was die eukaryotischen Zellen durch Kompartimentierung – eine räumliche Trennung verschiedener biochemischer Prozesse in membranumschlossenen Organellen – vermeiden. Ein sehr aktuelles Forschungsfeld innerhalb der Synthetischen Biologie beschäftigt sich daher mit der Frage, wie die Kompartimente für die Steigerung der Produktausbeuten genutzt werden können.

Ein wichtiger Erfolg wurde z. B. bei der Produktion von Benzylisoquinolin-Alkaloiden (BIA) erzielt. Zu dieser Klasse gehören viele pharmazeutisch relevante Verbindungen, wie die Betäubungsmittel Codein und Morphin. Für ihre Biosynthese müssen verschiedene pflanzliche Enzyme in die Hefe eingebracht werden, aber eines von ihnen (Norcochlorinsynthase) ist für die Zellen in größerer Menge toxisch, wenn es sich im Cytoplasma befindet. Wird es dagegen in abgeschlossene Zellorganellen – die Peroxisomen – dirigiert, bleibt die toxische Wirkung aus und die Zellen können deutlich mehr BIA-Vorstufenmoleküle synthetisieren [8]. Neben solchen Beispielen, wie bestehende Organellen umfunktioniert werden kön-



◄ **Abb. 3:** Membranumschlossene Vesikel als künstliche metabolische Kompartimente. Die Vesikel stellen separate Reaktionsräume dar, in denen die gewünschten Stoffwechselreaktionen, etwa die Muconsäurebiosynthese, getrennt vom normalen Zellstoffwechsel stattfinden können. Die Vesikel wurden mit dem Grün fluoreszierenden Protein und das Cytosol mit dem Rot fluoreszierenden Protein mCherry sichtbar gemacht.

nen, gibt es auch Ansätze, neuartige membranumschlossene Kompartimente zu generieren und damit das natürliche Repertoire der Zelle zu erweitern.

So ist es uns kürzlich gelungen, drei Enzyme für die Biosynthese von Muconsäure, einer Vorstufe von Nylon, in bläschenartige Vesikel zu verpacken (**Abb. 3**), die in Hefe in dieser Form nicht vorkommen [9, 10]. Das Prinzip haben wir uns bei Pflanzen abgeschaut: Sie verpacken in Samen spezielle Proteine in Vesikel, die dann bei der Keimung als Speicherstoffe nützlich sind, aber keine enzymatische Aktivität haben. Eine große Unbekannte am Anfang unseres Projekts war daher die Frage, ob die Enzyme der Muconsäurebiosynthese in den Vesikeln ihre Aktivität behalten. Tatsächlich konnten wir für jeden Reaktionsschritt ein Enzym finden, das auch in den Vesikeln seine Aufgabe erfüllt. Das eröffnet die Möglichkeit, die Muconsäuresynthese vom Rest der Zelle abzuschirmen und zeigt beispielhaft, wie die Arbeitsteilung in der Zelle durch neue Reaktionsräume optimiert werden kann.

Solche schnellen Fortschritte in der Biotechnologie wären ohne die Wissensfülle aus der Grundlagenforschung nicht möglich gewesen. Die Erforschung von *Saccharomyces cerevisiae* bleibt spannend und wird bei der gesellschaftlichen Transformation zu nachhaltigeren Wirtschaftsformen eine wichtige Rolle spielen. ■

Literatur

- [1] Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096
- [2] Zhang W, Mitchell LA, Bader JS et al. (2020) Synthetic genomes. *Annu Rev Biochem* 89: 77–101

- [3] Jansen MLA, Bracher JM, Papapetridis I et al. (2017) *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: From academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res* 17: fox044
- [4] Sauer M, Porro D, Mattanovich D et al. (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol* 26: 100–108
- [5] Paddon CJ, Keasling JD (2014) Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol* 12: 355–367
- [6] Nielsen J, Larsson C, van Maris A et al. (2013) Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Curr Opin Biotechnol* 24: 398–404
- [7] Cravens A, Payne J, Smolke CD (2019) Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nat Commun* 10: 2142
- [8] Grewal PS, Samson JA, Baker JJ et al. (2021) Peroxisome compartmentalization of a toxic enzyme improves alkaloid production. *Nat Chem Biol* 17: 96–103
- [9] Reifemath M, Oreb M, Boles E et al. (2020) Artificial ER-derived vesicles as synthetic organelles for *in vivo* compartmentalization of biochemical pathways. *ACS Synth Biol* 9: 2909–2916
- [10] Reifemath M, Tripp J, Oreb M et al. (2016) Synthetische subzelluläre Kompartimente in eukaryotischen Zellen. *BIOspektrum* 22: 374–377

Funding note: Open Access funding enabled and organized 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:

Dr. Mislav Oreb
Institut für Molekulare Biowissenschaften
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 9
D-60438 Frankfurt a. M.
m.oreb@bio.uni-frankfurt.de
<https://orcid.org/0000-0002-6118-1517>

AUTORINNEN UND AUTOREN



Mislav Oreb

1996–2002 Studium der Biologie an der Universität Braunschweig. 2004–2008 Doktorand bei Prof. Dr. E. Schleiff an der LMU München und an der Universität Frankfurt a. M. 2009–2010 Postdoc bei Prof. Dr. T. Hugel an der TU München. Seit 2010 Gruppenleiter an der Universität Frankfurt a. M. bei Prof. Dr. E. Boles.



Joanna Tripp

1994–2000 Studium der Biologie an der Universität Frankfurt a. M.; dort 2000–2005 Doktorandin bei Prof. Dr. L. Nover. 2005–2007 Postdoc bei Prof. Dr. K. Keegstra am MSU-DOE Plant Research Laboratory, East Lansing, USA. 2008–2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. E. Schleiff an der Universität Frankfurt a. M. Seit 2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Frankfurt a. M. bei Prof. Dr. E. Boles.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer