

Vesikel aus dem ER

Neuartige, metabolisch aktive Organellen in eukaryotischen Zellen

JOANNA TRIPP, MISLAV OREB, ECKHARD BOLES
 INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOWISSENSCHAFTEN, GOETHE-UNIVERSITÄT
 FRANKFURT A. M.

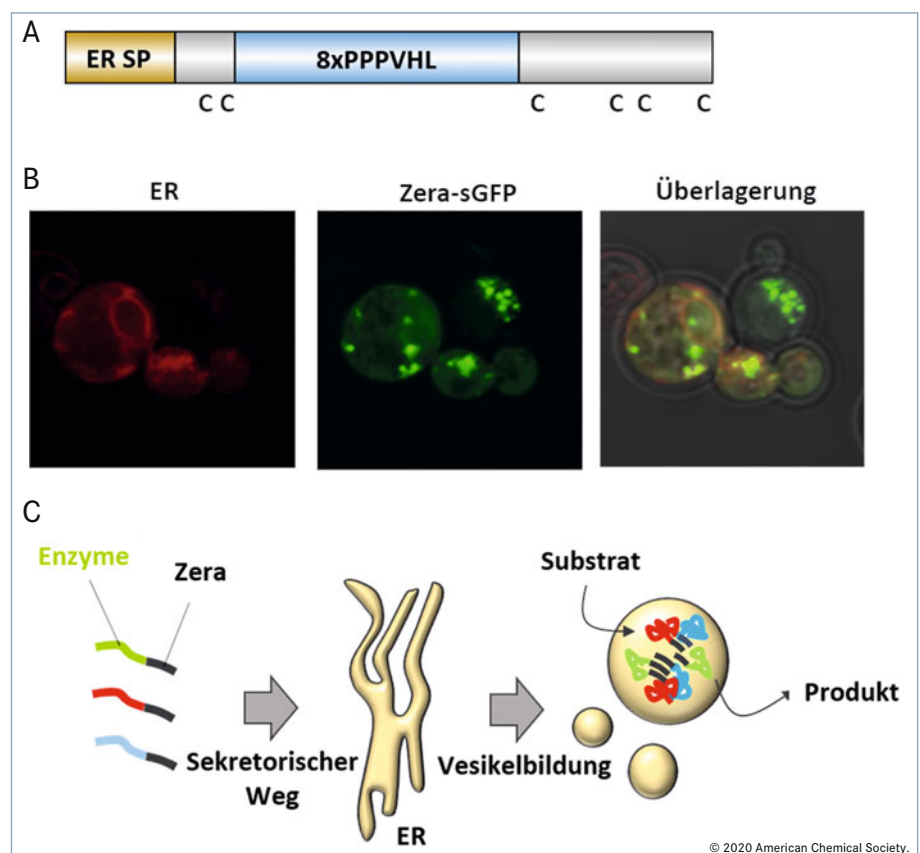
Microbial production of chemicals is a sustainable alternative to conventional industrial processes. However, the implementation of exogenous metabolic pathways is hampered by slow diffusion rates, competing pathways, or secretion of intermediates. Pre-existing organelles have been harnessed to overcome these problems, but these approaches suffer from interference with endogenous pathways. We have developed a new concept for the compartmentalization of enzymatic pathways in ER-derived vesicles.

DOI: 10.1007/s12268-022-1777-7
 © Die Autorinnen und Autoren 2022

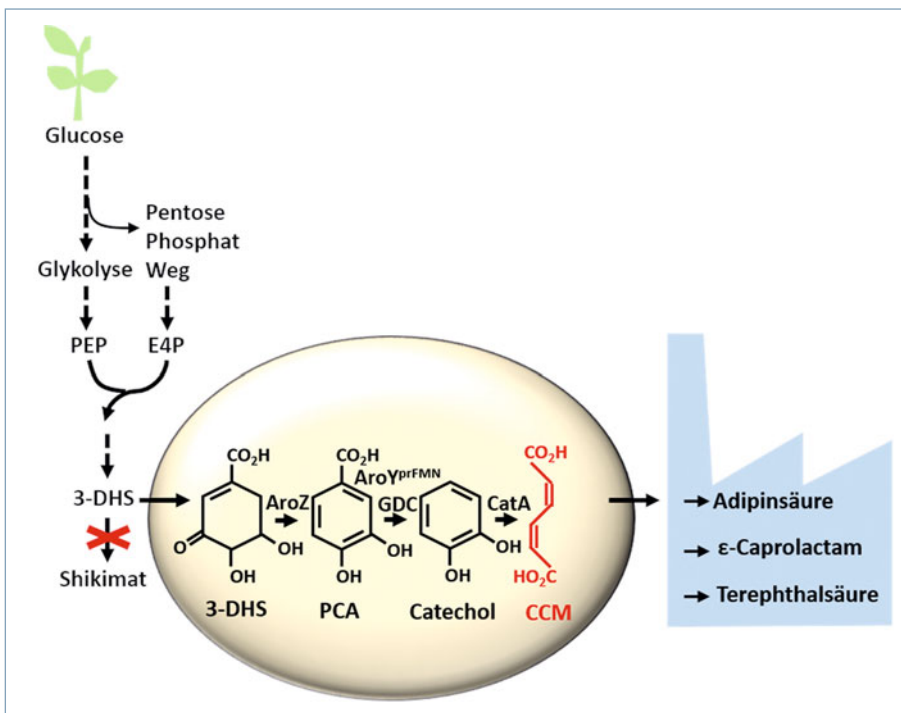
■ Biotechnologische Produktionsverfahren sind eine ressourcenschonende Alternative zu den traditionellen, erdölbasierten Prozessen der chemischen Industrie. Mithilfe mikrobieller Zellfabriken können pflanzliche Rohstoffe in eine breite Palette von Grund- und Feinchemikalien, Arznei- und Kraftstoffe umgewandelt werden. Aufgrund ihrer Robustheit und Toleranz gegenüber industriellen Bedingungen wird die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* schon seit vielen Jahren für biotechnologische Produktionsverfahren genutzt.

Veränderungen des Stoffwechsels und Einschleusung von Fremdgenen mit Methoden des Metabolic Engineerings haben in den vergangenen Jahren die biotechnologische Herstellung einer Vielzahl von Produkten ermöglicht [1] und zu erheblichen Steigerungen in Produktausbeuten geführt. Dabei kann es jedoch zu Problemen kommen. Oft werden Zwischenprodukte, bevor sie weiterverwertet werden können, aus der Zelle ausgeschleust oder reagieren mit anderen Substanzen zu unerwünschten Nebenprodukten. Weiterhin kann die Anhäufung toxischer Zwischenprodukte den Zellstoffwechsel beeinträchtigen. Die Natur löst diese Probleme durch Einschluss von Stoffwechselwegen in membranumschlossene Reaktionsräume, in Organellen. Zelleigene Organellen werden

in der Biotechnologie zunehmend für das Einbringen heterologer Stoffwechselwege genutzt. So wurde der Biosyntheseweg für die Produktion des Biotreibstoffs Isobutanol komplett in die Mitochondrien der Hefe eingebracht [2]. Die Nutzung von Mitochondrien wird jedoch durch das Vorhandensein endogener Stoffwechselwege erschwert. Seit einigen Jahren werden zunehmend Peroxisomen eingesetzt, um toxische Enzyme zu isolieren [3] und diverse heterologe Produktionswege einzubringen [4]. Die relativ unselektive Permeabilität der Peroxisomenmembran für niedermolekulare Substanzen stellt für biotechnologische Anwendungen oft einen Vorteil dar, kann sich aber auch nachteilig aus-



▲ **Abb. 1:** Neuartige metabolische Vesikel. **A**, Aufbau der Zera-Sequenz mit Signalpeptid (SP) für den Transport in das ER (gelb), cysteinreicher Region (grau, Cysteine als „C“) und repetitiver, prolinreicher Region (blau). **B**, fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Vesikelbildung. **C**, Die Fusion von Zera an Enzyme führt zum Einschluss dieser Enzyme in aus dem ER gebildeten Vesikeln. Adaptiert mit Erlaubnis aus [7]. © 2020 American Chemical Society.



▲ **Abb. 2:** Synthese von *cis,cis*-Muconsäure (CCM) in ER-abgeleiteten Vesikeln. Aus Glucose wird über den Shikimatweg 3-Dehydroshikimat (3-DHS) gebildet. 3-DHS dient als Ausgangsstoff für die Synthese von CCM in den Vesikeln. Die drei Reaktionsschritte werden durch die Enzyme 3-DHS-Dehydratase (AroZ), PCA-Decarboxylase (GDC bzw. AroY^{prFMN}), und Catechol-1,2-Dioxygenase (CatA) katalysiert. PEP: Phosphoenolpyruvat; PCA: Protocatechuat.

wirken. Auch liegen Peroxisomen in *S. cerevisiae* nur in geringer Zahl vor, wenn Zucker als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Eine Stimulierung der Peroxisomenproliferation erfordert weitere genetische Modifizierungen [3]. Entsprechend wird in der Biotechnologie nach neuen Ansätzen gesucht, um Kompartimente *de novo* (*bottom-up*) zu generieren.

Das endoplasmatische Retikulum als Basis für neuartige Organellen

Wir haben ein neues Verfahren entwickelt, um künstliche Organellen in Hefezellen zu erzeugen und darin Stoffwechselwege einzubringen, die metabolischen Vesikel. Dazu haben wir ein aus einem pflanzlichen Speicherprotein abgeleitetes Peptid verwendet.

Pflanzliche Speicherproteine werden in Samen in aus dem ER abgeschnürte Vesikel verpackt und dienen als Aminosäurereservoir für den Keimling. Die modifizierte N-terminale Domäne des Speicherproteins γ -Zein („Zera“) aus Mais reicht aus, um die Bildung dieser Vesikel zu induzieren [5]. Zera beinhaltet ein N-terminales Signalpeptid, welches den „Adressaufkleber“ für den Transport in das ER darstellt und danach abgespalten wird. Gefolgt wird diese Zielsteuerungssequenz von einer charakteristi-

schen repetitiven prolinreichen Sequenz (8xPPPVHL) und einer C-terminalen cysteinreichen Region (**Abb. 1A**). Die cysteinreiche Region sorgt über die Bildung von Disulfidbrücken für den Verbleib im ER. Zusammen mit der repetitiven prolinreichen Sequenz vermittelt sie die Bildung großer Oligomere und schließlich den Einschluss dieser Oligomere in Vesikel. An Zera fusionierte Proteine werden dabei miteingeschlossen. Die dichte Packung von an Zera fusionierten Proteinen in diesen Vesikeln haben sich Forscher bereits für die Produktion von Enzymen in Pflanzenzellen zunutze gemacht [6]. Fusioniert an den Fluoreszenzmarker superfolderGFP (Zera-sGFP) führt das Peptid Zera auch in Hefezellen zur Bildung von an das ER (sichtbar gemacht mit dem Markerprotein mCherry) angrenzenden Vesikeln (**Abb. 1B**).

Produktion von *cis,cis*-Muconsäure in metabolischen Vesikeln

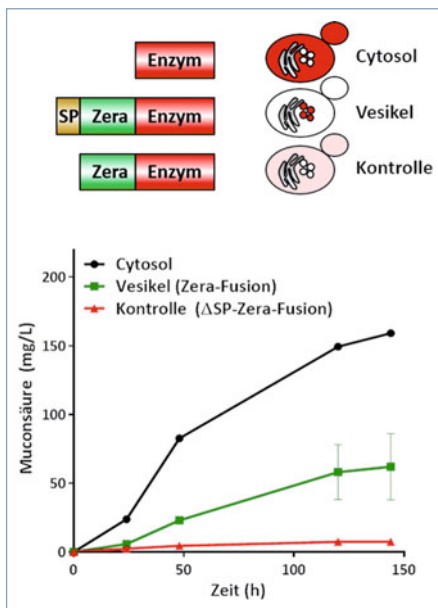
Um die Eignung dieser Zera-induzierten Vesikel als stoffwechselaktive Kompartimente zu untersuchen, haben wir einen dreistufigen Reaktionsweg zur Synthese der Basischemikalie *cis,cis*-Muconsäure (CCM) in die Vesikel eingebracht (**Abb. 1C**, [7]). In der chemischen Industrie kann CCM als Aus-

gangstoff für die Synthese von Adipinsäure, Terephthalsäure, und ϵ -Caprolactam dienen, wichtigen Bausteinen bei der Produktion von Kunststoffen (**Abb. 2**).

CCM kann biotechnologisch in Hefe aus Zuckern wie Glucose – also aus nachwachsenden Rohstoffen – erzeugt werden (**Abb. 2**, [8]). Dafür muss der Syntheseweg für aromatische Aminosäuren (Shikimatweg) umfunktioniert werden. Im Shikimatweg fließen zwei Stoffwechselwege des zentralen Kohlenstoffwechsels, die Glykolyse und der Pentosephosphatweg, über ihre Zwischenprodukte Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P) zusammen. Nach ihrer Kondensation entsteht in mehreren enzymatisch katalysierten Schritten 3-Dehydroshikimat (3-DHS). Eine Weiterverarbeitung zu Shikimat wird nun durch Eliminierung der betreffenden enzymatischen Aktivität unterbunden. 3-DHS wird durch die Überexpression der heterologen Enzyme 3-DHS-Dehydratase AroZ, Protocatechuat(PCA)-Decarboxylase GDC und Catechol-Dioxygenase CatA über die Zwischenprodukte Protocatechuat und Catechol zu CCM umgesetzt. Limitierend für die Produktausbeute ist der von der PCA-Decarboxylase katalysierte Schritt zu Catechol.

Die Fusion der drei Enzyme des Muconsäurewegs an Zera führte zu einem erfolgreichen Einbau in die Vesikel. Eines der verwendeten Enzyme, die PCA-Decarboxylase (GDC), zeigte jedoch keine Aktivität bei Zufütterung des Substrats Protocatechuat. Hier könnten die N-terminale Zera-Fusion, aber auch folgende spezifische Eigenschaften des ER-Milieus eine Rolle spielen: (1) Proteine des ER werden über N-Glykosylierung modifiziert, (2) im ER liegt ein oxidatives Milieu vor, d. h. Proteine werden durch Disulfidbrücken quervernetzt, und (3) es steht eine andere Ausstattung an Chaperonen, also Helfern für die Proteinfaltung, zur Verfügung als im Cytosol. Einen Einfluss der N-Glykosylierung konnten wir durch Mutagenese entsprechender Aminosäuren ausschließen.

Die erfolgreiche Etablierung des funktionellen Wegs in den Zera-induzierten Vesikeln gelang erst durch Verwendung der bakteriellen PCA-Decarboxylase AroY (**Abb. 3**). Zellen mit den die drei Zera-fusionierten Enzyme enthaltenden metabolischen Vesikeln (Zera-Fusion) produzierten bis zu 62 mg L⁻¹ CCM. Der für die Aktivität von AroY benötigte Ko-Faktor prenyliertes FMN (prFMN) sowie das Substrat 3-DHS können offenbar über die Vesikelmembran aufgenommen und



▲ **Abb. 3:** Funktionalität der metabolischen Vesikel. Die Produktion von *cis,cis*-Mucosäure in Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation des Biosyntheseweges wurde im Kulturmedium nachgewiesen. Adaptiert mit Erlaubnis aus [7]. © 2020 American Chemical Society.

das Produkt CCM ausgeschleust werden. Dass nicht importiertes, cytosolisch lokalisiertes Enzym zur Aktivität des vesikulären Stoffwechselwegs beiträgt, konnten wir mit einer Kontrolle ausschließen. Hier wurden die drei mit Zera fusionierten Enzyme mit deletiertem Signalpeptid (Δ SP-Zera-Fusion) im Cytosol exprimiert und wiesen dann fast keine Aktivität auf (**Abb. 3**). Das Ergebnis zeigt insgesamt eine vielversprechende Umsetzung unseres Konzepts, obwohl noch weiterer Optimierungsbedarf besteht, da der cytosolische Weg bisher noch effektiver ist (159 mg L^{-1} CCM).

Potenzial und Herausforderungen für die künftige Forschung

Es ist uns gelungen, ein neuartiges, stoffwechselaktives Kompartiment zu erzeugen, das die Möglichkeit bietet, beliebige Biosynthesewege zu integrieren. Die Methode hat ein großes Potenzial, wie z. B. einen Proteinabbau im Cytoplasma zu verhindern und, durch die dichte Packung der Enzyme, die Umsetzung von Intermediaten zu beschleunigen. Zur weiteren Optimierung bieten sich

verschiedene Ansatzpunkte an. So ist die Vesikelbildung abhängig von der verfügbaren Oberfläche der ER-Membran. Durch Modulierung regulatorischer Faktoren kann die Proliferation der ER-Membran erhöht werden. Eine Steigerung der Menge an ER-Chaperonen ist ein zusätzlicher möglicher Lösungsansatz, um die Aktivität vesikulärer Enzyme zu steigern, ebenso wie eine Abspaltung der gesamten Zera-Sequenz nach dem Einschluss der Enzyme in die Vesikel. Die Durchlässigkeit der vesikulären Membran zu manipulieren, stellt eine weitere zukünftige Herausforderung dar. Welche Transporter sind in der Vesikelmembran vorhanden? Enthält das Lumen noch typische ER-Proteine? Diese Fragen müssen in weiteren Forschungsarbeiten beantwortet werden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (FKZ: 031A542 und 031B0218) für die finanzielle Unterstützung ihrer Arbeiten zur künstlichen Kompartimentierung.

Literatur

- [1] Borodina I, Nielsen J (2014) Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J* 5: 609–620
- [2] Avalos JL, Fink GR, Stephanopoulos G (2013) Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves production of branched chain alcohols. *Nat Biotechnol* 31: 335–341

- [3] Grewal PS, Samson JA, Baker JJ et al. (2021) Peroxisome compartmentalization of a toxic enzyme improves alkaloid production. *Nat Chem Biol* 17: 96–103
- [4] Kulagina N, Besseau S, Papon N et al. (2021) Peroxisomes: a new hub for metabolic engineering in yeast. *Front Bioeng Biotechnol* 9: 659431
- [5] Llop-Tous I, Madurga S, Giral E et al. (2010) Relevant elements of a maize gamma-zein domain involved in protein body biogenesis. *J Biol Chem* 285: 35633–35644
- [6] Llop-Tous I, Ortiz M, Torrent M et al. (2011) The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants. *PLoS One* 6: e19474
- [7] Reifenrath 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
- [8] Bruckner C, Oreb M, Kunze G et al. (2018) An expanded enzyme toolbox for production of *cis, cis*-muconic acid and other shikimate pathway derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2: foy017

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. Joanna Tripp
 Institut für Molekulare Biowissenschaften
 Goethe-Universität Frankfurt
 Max-von-Laue-Straße 9
 D-60438 Frankfurt a. M.
 j.tripp@bio.uni-frankfurt.de
<https://orcid.org/0000-0003-1783-4098>

AUTORINNEN UND AUTOREN



Joanna Tripp, Mislav Oreb und Eckhard Boles (v. l. n. r.) arbeiten am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Frankfurt a. M. am *Metabolic Engineering* von Bäckerhefe und an neuen Ansätzen zur Kompartimentierung biotechnologisch interessanter Stoffwechselwege.