

Synthetische Biotechnologie: Die funktionelle Erweiterung von Bioproduktionsorganismen mit modularen Komponenten

Dr. Stefan M. Schiller, Bionic Chemistry & synthetic Nanobiotechnology Lab, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Zentrum für Biosystemanalyse ZBSA, Habsburger Str. 49, 79104 Freiburg, IMTEK Department of Microsystems Engineering, Georges-Köhler-Allee 103, Freiburg Institute for Advanced Studies (FRIAS), Albertstrasse 19

Die Verlagerung der stofflichen und energetischen Ströme hin zu einer biologisierten Industrie findet ihren Niederschlag in der nationalen Biokökonomie-Strategie 2030. Zu Realisierung bedarf es der Weiterentwicklung und funktionellen Erweiterung biotechnologischer Ansätze und Prozesse. In diesem Kontext ist die Erweiterung von Zellfunktionen jenseits der natürlichen Zellausstattung mit neuen modularen Komponenten ein wichtiger Schritt hin zur neuen biotechnologischen Fähigkeiten der Zelle.

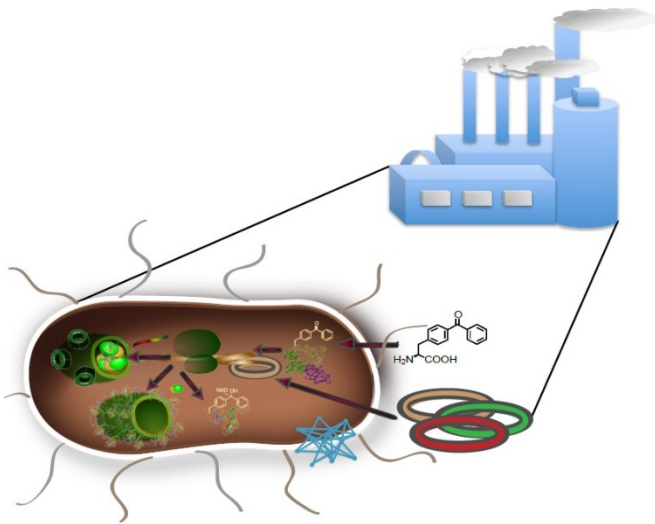


Abbildung 1: Komponenten für einen modularen „universellen Produktionsorganismus“ die von uns adressiert werden.

In unserer Arbeit fokussieren wir uns auf folgende Aspekte: 1. Das Design, die Konstitution und funktionelle Definition bzw. Applikation von *de novo* Kompartimenten/Organellen & Chassisengineering, 2. Die Erweiterung des genetischen Codes durch das Redesign des Translationsnetzwerkes für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit bioorthogonalen Seitengruppen, 3. xenobiotischen Enzymen & Enzymredesign, und 4. Bioprozessentwicklung mit Metabolic Flux Design & Metabolom-Analysen. Im

Rahmen der Präsentation werden Aspekte der kodierten Kompartimententwicklung *in vitro* und *in vivo* mit den Modifikationsmöglichkeiten der Kompartimente durch definierte Biofunktionalisierung (z.B. gesteuerte Isopeptidbindungsbildung zwischen Kompartiment-konstituierendem Protein und einem zusätzlichem Proteinbaustein, z.B. Enzym) und unnatürlichen Aminosäuren gezeigt. Die Implementierung neuer Funktionalitäten erlaubt die modulare Kreation komplexer Systeme hin zu Nanofabriken *in vivo* durch *de novo* Organellen da diese als „frei kodierbare“ Module noch nicht in den funktionellen Kontext der zellulären Netzwerkkomplexe eingebunden sind.¹ In diesem Kontext besitzen auch andere Proteinstrukturelemente und Superstrukturen die katalytisch funktionalisierbar sind steigendes Interesse.²⁻³ Durch die Kompartimentalisierung von Prokaryonten soll es möglich werden neue Synthesewege und Enzymkaskaden in Prokaryonten ebenso zu realisieren wie deren *in vitro* Applikation als Nanokompartiment. Durch die Wahl von proteinbasierten Amphiphilen zur Konstitution von membranbasierten Organellen konnte die Konstitution organellartiger NanoBioSysteme für Anwendungen *in vivo* und *in vitro*

erreicht werden.⁴ Ermöglicht wurde die bibliotheksartige Kombination von modularen Block-Domänensequenzen durch die Entwicklung einer „Ein-Vektor-Tool-Box-Plattform“ („one-vector-toolbox-platform“ (OVTP)).⁵ Diese Plattformtechnologie erlaubt es mit exakter Kontrolle über die Sequenz und die seitenspezifische Einführung nicht-biogener Funktionen das intentionelle Design von Strukturen und Funktionen auch auf der Basis von langen und repetitiven Sequenzmotiven zu realisieren. Das Redesign der ribosomalen Proteinbiosynthese zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren durch die Erweiterung des genetischen Codes mit Hilfe des Redesign des Translationsnetzwerkes ist ein wichtiges Werkzeug, um artifizielle chemische Funktionen genetisch kodiert in Proteine einzuführen. Hierzu wurden im Hinblick auf die Ursprungszelllinie des modularen Produktionsorganismus (*E. coli*) orthogonale tRNAs und tRNA-Synthetasen entwickelt.⁶⁻⁸ Diese erlauben den seitenspezifischen, genetisch kodierten, cotranslationalen Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit neuen chemischen Gruppen in der Seitenkette. Über diese neuen Seitengruppen der unnatürlichen Aminosäuren können funktionellen Gruppen mit bioorthogonaler Reaktivität in Proteine eingeführt werden. Diese können dann *in vivo* und *in vitro* selektiv und seitenspezifisch mit kleinen Molekülen oder mit komplementär funktionalisierten Proteinen konjugiert werden.

Dies erlaubt uns ein weitreichendes Engineering von Enzymfunktionen z.B. die Transformation eines Kofaktors zu einer prosthetischen Gruppe mit weitreichendem Anwendungspotential bei der Applikation xenobiotischer oder artifizieller Kofaktoren. Erste Anwendungen von modular mit protein-basierten Organellen (PBOs) modifizierten/funktionell erweiterten Zellen für die Bioproduktion von ultrapotenten Wirkstoffen/Enzymen wurden realisiert und werden gezeigt. Die Weiterentwicklung der etablierten und die Addition neuer modularer Funktionen wird erläutert und die weiteren Entwicklungsmöglichkeiten z.B. die Implementierung von elektrischer und solarer Energie in Bioprozesse sowie Erweiterung der systemanalytischen Möglichkeiten bis hinunter zu wenigen Zellen aufgezeigt.

Literatur

1. Schreiber, A., Schiller, S. M. „*Nanobiotechnology of Protein Compartments: Steps towards Nanofactories*“ **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials** (ICE Virtual Library) **2013**, 4, 2, 157-164
2. Schreiber, A., Zaitseva, E., Thomann, Y., Thomann, R., Dengjel, J., Hanselmann, R., **Schiller, S. M.** „*Protein Yoctowell Nanoarchitectures: Assembly of Donut Shaped Protein Containers and Nanofibres*“ **Soft Matter** **2011**, 7 (6), 2875-2878
3. Schreiber, A., Huber, M. C., Cölfen, H., ***Schiller, S. M.** „*Protein Adaptor with Genetically Encoded Interaction-Sites Guiding the Hierarchical Assembly of Plasmonically Active Nanoarchitectures*“, DOI: 10.1038/ncomms7705 **Nature Communications**, **2015**, 6, article number 6705
4. Huber, M. C., Schreiber, A., von Olshausen, P., Varga, B. R., Kretz, O., Joch, B., Barnert, S., Schubert, R., Eimer, S., Kele, P., Schiller, S. M. „*Designer amphiphilic proteins as building blocks for the intracellular formation of organelle-like compartments*“ **Nature Materials** **2015**, 14(1), 125-132
5. Huber, M. C., Schreiber, A., Benz, K., Schiller, S. M. „*Introducing a combinatorial DNA-toolbox platform constituting defined protein-based biohybrid-materials*“ **Biomaterials** **2014** 35, 8767-8779
6. Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P. G. Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*. **Science** **2001**, 292, 498–500
7. Wang, J., Schiller, S. M., Schultz, P. G. „*A Biosynthetic Route to Dehydroalanine-Containing Proteins*“ **Angew. Chem.** **2007**, 46, 36, 6849-6851
8. Armen, R. S., Schiller, S. M., Brooks III, C. L. „*Steric and Thermodynamic Limits of Design for the Incorporation of Large Un-Natural Amino Acids in Aminoacyl-tRNA Synthetase Enzymes*“ **Proteins** **2010**, 78, 1926-1938