

Schmerzmittel brauen: Eine Hefe-Zellfabrik produziert Opiate aus Zucker

Matthias Höhne und Johannes Kabisch*

Biokatalyse · Naturstoffe · Opioide ·
Synthetische Biologie · Wirkstoff-Synthese

SSeit Jahrhunderten nutzt die Menschheit Hefe zur Herstellung von Brot und zum Brauen alkoholischer Getränke. Mittlerweile ist *Saccharomyces cerevisiae* zur wichtigsten eukaryotischen Zellfabrik avanciert und findet in einer Vielzahl biotechnologischer Prozesse zur Herstellung von Chemikalien und Enzymen Anwendung. Smolke und Mitarbeitern ist es nun gelungen, eine erste Hefe-Zellfabrik zur Umwandlung von D-Glukose in die Opiate Thebain und Hydrocodon zu erschaffen.^[1]

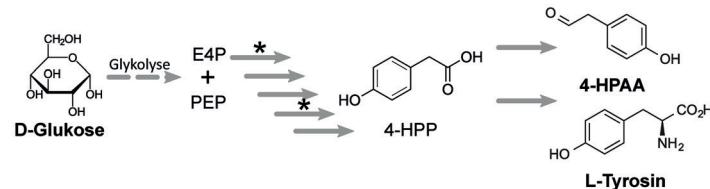
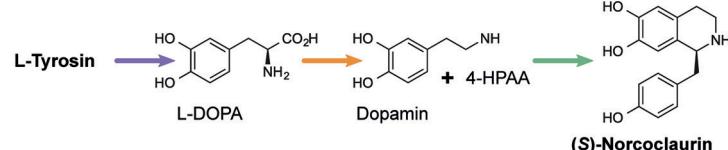
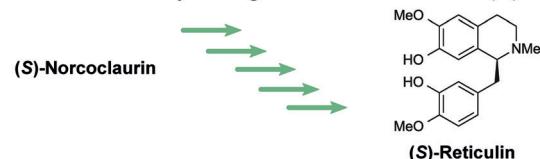
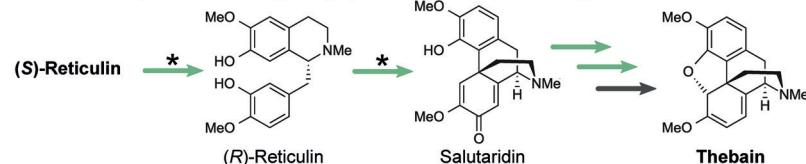
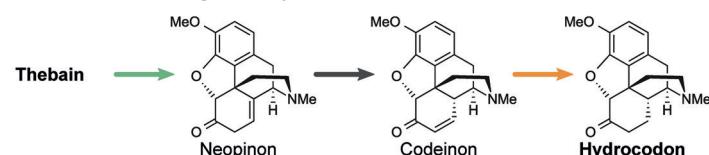
Die von den Autoren hierfür gewählte Herangehensweise basiert auf der Anwendung synthetischer Biologie (SynBio). Während aktuell für Biokatalysen meist die klassische, rekombinante DNA-Technologie genutzt wird und der Fokus auf der Anwendung eines oder weniger Enzyme für einzelne Biotransformationen liegt, zielt SynBio darauf ab, rational entwickelte, komplexe Systeme wie Organismen mit komplett neuen Stoffwechselwegen zu erzeugen.^[2] Opiat-Alkaliole stellen komplexe, funktionalisierte tertiäre Amine dar, und die Machbarkeitsstudie ihrer Synthese durch den SynBio-Ansatz hebt das Potential dieser Technologie hervor: Die Arbeit von über einem Jahrzehnt führte zu einem Hefestamm, der 23 Gene aus Hefe, Pflanzen, wie dem Opiatproduzierenden *Papaver somniferum*, Bakterien und Ratte, künstlich exprimiert. Diese Arbeit entspricht dem größten synthetischen Stoffwechselweg, der bislang publiziert wurde. Die Eleganz des Systems – gegenüber der Vielzahl an Versuchen einer chemischen Totalsynthese von Opiaten^[3] – liegt darin, dass es sich um eine Art Eintopfreaktion handelt. Keine zwischenliegenden Aufarbeitungs- oder Reinigungsschritte sind notwendig, und Glukose und einfache Aminosäuren waren die alleinigen Ausgangsstoffe und Reagentien für den Aufbau aller benötigten Katalysatoren. In den folgenden Abschnitten werden wir die wichtigsten Erfolge und Herausforderungen dieser Studie zusammenfassen, die das große Potential, aber auch die Hindernisse der aktuellen SynBio-Technologie aufzeigt.

[*] Prof. Dr. M. Höhne
Universität Greifswald, Protein Biochemie, Institut für Biochemie
F.-Hausdorff-Straße 4, 17489 Greifswald (Deutschland)
Dr. J. Kabisch
Universität Greifswald, Nachwuchsgruppe Biofuels, Institut für Biochemie
F.-Hausdorff-Straße 4, 17489 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: kabisch@uni-greifswald.de

Der Aufbau der Opiat-Grundstruktur bedarf der Kombination einiger Amin-manipulierender Enzyme (Schema 1). Schlüsselschritte sind wie folgt: 1) Eine asymmetrische Pictet-Spengler-Reaktion baut das Tetrahydroisoquinolingerüst auf (Modul III). 2) Das durch nachfolgende Hydroxylierungs- und Methylierungsschritte gebildete tertiäre Amin (*S*-Reticulin geht eine Stereoinversion ein (Modul VI). 3) Das tetracyclische Salutaridin wird durch intramolekulare C-C-Kupplung erhalten. Darauf folgende Reduktions- und Tautomerisierungsreaktionen bilden letztlich das Opiat Hydrocodon.

Die Wissenschaftler wählten ein für SynBio typisches, modulares Vorgehen: In *S. cerevisiae* wurden sieben DNA-Module eingebracht, die jeweils für zwei bis sieben Enzyme codieren (Schema 1). Im Design der Module zeigt sich, wie die Smolke-Gruppe die Aufgabe anging, einen komplexen Stoffwechselweg zu konstruieren:

- 1) Metaboliten aus dem Primärstoffwechsel müssen in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen, um den metabolischen Fluss zu den Zielprodukten zu leiten. Modul I gewährleistet den metabolischen Fluss von Glukose zu Tyrosin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd (4-HPAA) als wichtige Vorstufenmoleküle. In zukünftigen Projekten kann solch ein Hefestamm als Grundgerüst für weitere „Einstech“-DNA-Module fungieren, um andere Substanzen ausgehend von Tyrosin aufzubauen.
- 2) Vier der sieben Module ermöglichen über eine Reihe von Transformationen die Bildung von Metabolitstrukturen, die jeweils einen Verzweigungspunkt in der Biosynthese darstellen. Dies unterstreicht erneut das modulare Konzept, wiederverwendbare, funktionale Einheiten zu nutzen: So könnten z.B. die Norcoclaurin-, Reticulin- und Thebain-produzierenden Stämme durch weitere Module ergänzt werden, um andere Derivate der Isochinolin-Alkaloid-Familie zu produzieren.
- 3) Ein einzelner enzymatischer Schritt im kompletten Stoffwechselweg benötigte Tetrahydrobiopterin (BH4) als Cofaktor, der in *S. cerevisiae* jedoch nicht gebildet wird. Daher wurde ein BH4-Synthesemodul entworfen. Dieses kann später für die Konstruktion „sofort betriebsbereiter“ Hefestämme mit anderen, BH4-abhängigen Stoffwechselwegen genutzt werden.
- 4) Um einen ausreichenden Fluss durch alle Schritte des synthetischen Stoffwechselwegs zu gewährleisten, mussten Engpässe beseitigt werden. Modul V stellt größere

Modul I: Stoffwechsel-Flussoptimierung zu Tyr & 4-HPAA**Modul III:** Vom L-Tyr & 4-HPAA zum Norcoclaurin**Modul IV:** Methylierung von Norcoclaurin zu (S)-Reticulin**Modul VI:** Epimerisierung zu (R)-Reticulin und Bildung von Thebain**Modul VII:** Bildung von Hydrocodon**Ursprung der Gene:**

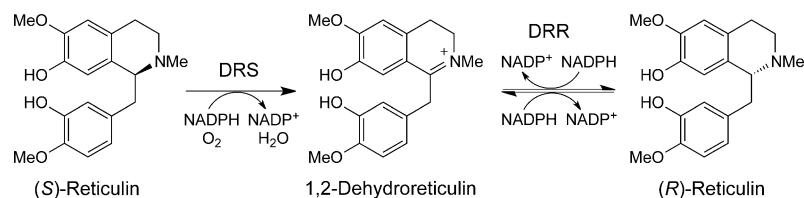
Hefe → Ratte → Pflanze → Bakterie → Spontan → * optimiertes Protein

Schema 1. Konstruierte SynBio-Module für die Synthese von Opiaten aus Glukose. E4P = Erythrose-4-phosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat.

Mengen dreier geschwindigkeitsbestimmender Enzyme bereit, um die Akkumulation dreier Intermediate zu verringern, die in einer Flussanalyse identifiziert wurden.

Eine weitere bedeutende Leistung bei diesem Projekt war die Identifizierung der Aminosäuresequenz der Reticulin-Isomerase (kürzlich unabhängig von Farrow et al. publiziert^[4]). Damit wurde ein lang gesuchtes, fehlendes Binde-

glied gefunden, um vorher entwickelte Schritte in Richtung der Opiatsynthese in Hefe zu verbinden. Die Stereoinversion wird durch eine zweistufige Reaktion erreicht: (S)-Reticulin reagiert in einem P450-Oxidase-katalysierten Schritt mit molekularem Sauerstoff und bildet ein Imin-Intermediat. Eine NADP-abhängige Reduktase bildet anschließend das *R*-Enantiomer (Schema 2). Die entdeckte Isomerase ist ein natürliches Fusionsprotein und enthält beide Aktivitäten. Im



Schema 2. Die Stereoinversion von Reticulin erfolgt in zwei Schritten und wird durch ein Fusionsprotein mit zwei katalytischen Domänen ermöglicht. DRS: 1,2-Dehydroreticulin-Synthase-Domäne, DRR: 1,2-Dehydroreticulin-Reduktase-Domäne.

Unterschied zu einer Racemisierung ist dieser Prozess unidirektional, da beide Schritte hoch enantioselektiv ablaufen und damit nur den Umsatz vom *S*- zum *R*-Enantiomer ermöglichen.^[4] Interessanterweise wurde kürzlich eine ähnliche Kaskade für die Deracemisierung von sekundären Aminen von Turners Gruppe publiziert: Eine umgestaltete Monoamin-Oxidase (MAO) wurde mit einer Imin-Reduktase (IRED) kombiniert.^[5] Damit besteht Zugang zu beiden Amin-Enantiomeren, wenn stereokomplementäre Enzyme verwendet werden. IREDs und MAOs werden zurzeit als wichtige Hilfsmittel für die biokatalytische Herstellung chiraler Amine erforscht.^[6]

Ein zweiter Schlüsselerfolg war die Optimierung der geschwindigkeitsbestimmenden Salutaridin-Synthase (SalSyn). Umfangreiche Analysen offenbarten eine unvorteilhafte Orientierung von SalSyn im endoplasmatischen Retikulum (ER), wodurch sie nur eingeschränkt für die Enzymkatalyse zur Verfügung stand. Zur Lösung dieses Problems wurde eine rational entworfene Bibliothek chimärer Proteine erstellt: In den Varianten wurde der N-terminale Bereich in variabler Länge entfernt und die verbliebene, katalytische Domäne mit N-terminalen Regionen aus pflanzlichen und bakteriellen P450-Oxygenasen fusioniert, deren korrekte Orientierung in die Hefe-ER-Membran aus früheren Studien bekannt war.

Die größte noch bevorstehende Aufgabe in dieser Konzeptstudie bleibt die Optimierung des Produkttiters: Ausgehend von 20 g L^{-1} Glukose konnten $6.4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Thebain und $0.3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Hydrocodon produziert werden. Diese Ausbeuten sind Größenordnungen entfernt von der 5-g L^{-1} -Grenze, die als Minimaltiter für eine praktikable Alternative zum Mohnanbau angesehen wird. Hier fehlten uns in der Studie eine eingehende Analyse der Gründe für diese geringe Ausbeute und eine Diskussion über mögliche Optimierungen. Andere SynBio-Projekte, wie die Hefe-basierte Produktion der Antimalaria-Vorstufe Artemisininsäure, haben ähnliche Aufgaben bewältigt.^[7] Die Firma Amyris nutzte eine Kombination aus Systembiologie (Computersimulation metabolischer Stoff-Flüsse), Metabolic Engineering sowie Bio- und Chemieprozess-Entwicklung, um innerhalb weniger Jahre die Ausbeuten von 100 mg L^{-1} auf 25 g L^{-1} zu erhöhen.^[8]

Traditionelle, pflanzliche Produktionsprozesse durch mikrobielle Prozesse zu ersetzen, birgt Vorteile wie kürzere Produktionszeiten (Tage gegenüber einem Jahr für die einjährige Mohnpflanze), Unabhängigkeit von externen Faktoren wie dem Klima und eine hohe Konsistenz von Chargen. Laut der Weltgesundheitsorganisation^[1] haben insbesondere Entwicklungsländer einen eingeschränkten bis gar keinen Zugang zu benötigten Schmerzmitteln, weshalb eine alternative Quelle für Schmerzmittel dieses Problem abmildern könnte. Die Arbeit von Galanie et al. stellt einen wichtigen Schritt in diese Richtung dar und zeigt, dass Wissenschaftler Lösungen für globale Probleme entwickeln können. Es verbleibt jedoch die Aufgabe sicherzustellen, dass diese Bemühungen der Gesellschaft zu Gute kommen, in diesem Fall insbesondere Menschen in Entwicklungsländern, die dringenden Bedarf an Schmerzmitteln haben. Darüber hinaus hat das Ersetzen eines traditionell pflanzlich basierten Prozesses

durch einen SynBio-basierten, mikrobiellen Prozess einen unvermeidbaren Einfluss auf die Märkte. Ein Fall mit vielen Parallelen ist die Herstellung von Artemisininsäure durch Hefe. Während diese ein wichtiger Schritt im Kampf gegen Malaria ist, bedroht sie ebenso das Gewerbe vieler Landwirte des einjährigen Beifußes (*Artemesia annum*) in malariageplagten Entwicklungsländern.^[9]

Wie bei allen disruptiven Technologien muss der Einfluss der synthetischen Biologie auf die Gesellschaft bewertet werden, besonders wenn sie zum Brauen von Substanzen mit hohem Missbrauchspotential genutzt werden kann. Die Publikation berührt diesen Punkt durch die Beschreibung der Auflagen die ein Labor, das mit Betäubungsmittel-produzierenden Mikroorganismen arbeitet, erfüllen muss. Diese umfassen Sicherheitsüberprüfungen der involvierten Wissenschaftler, gesteigerte biologische Sicherheitsmaßnahmen im Umgang mit den Hefestämmen und Laborsicherung sowie strikte Kontrolle durch die U.S.-Drogenaufsichtsbehörde.

Synthetische Biologie ist die jüngste Evolutionsstufe der Gentechnologie und wird es uns ermöglichen, fortgeschritten Biokraftstoffe, Grundchemikalien, Pharmazeutika und Feinchemikalien nachhaltig zu produzieren. Dr. Smolke und ihr Team sind bestrebt, ihre Verfahren mit ihrer komplett unter weiblicher Führung stehenden Firma Antheia (Griechische Göttin der Blumen) zu kommerzialisieren.

Danksagung

Wir danken Uwe Bornscheuer für seine fortwährende Unterstützung. Johannes Kabisch erhält Fördermittel durch die FNR (FKZ: 22007413) und ein Stipendium der Fonds der Chemischen Industrie.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1248–1250
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1266–1268

- [1] S. Galanie, K. Thodey, I. J. Trenchard, M. F. Interrante, C. D. Smolke, *Science* **2015**, *349*, 1095–1100.
- [2] a) J. Becker, C. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3328–3350; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3383–3407; b) J. C. Way, J. J. Collins, J. D. Keasling, P. A. Silver, *Cell* **2014**, *157*, 151–161.
- [3] J. W. Reed, T. Hudlicky, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 674–687.
- [4] S. C. Farrow, J. M. Hagel, G. A. W. Beaudoin, D. C. Burns, P. J. Facchini, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 728–732.
- [5] R. S. Heath, M. Pontini, S. Hussain, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2015**, DOI: 10.1002/cctc.201500822.
- [6] H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180–192.
- [7] C. J. Paddon, J. D. Keasling, *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 355–367.
- [8] W. C. DeLoache, Z. N. Russ, L. Narciss, A. M. Gonzales, V. J. J. Martin, J. E. Dueber, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 465–471.
- [9] J. Thomas, in *The Guardian*, **2013**, <http://www.theguardian.com/global-development/poverty-matters/2013/apr/12/synthetic-malaria-compound-artemisia-farmers>, Zugriff auf die Seite am 5.11.2015.

Eingegangen am 6. November 2015
 Online veröffentlicht am 6. Januar 2016