

EnergieCampus 2016 – Energiewende und Klimaschutz: analog und digital
Stiftung Energie & Klimaschutz Baden-Württemberg

Promotionszusammenfassung
**„Rekombinante Synthese organischer Verbindungen
in Cyanobakterien“**

Fabian Nies

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lamparter

Lehrstuhl für Allgemeine Botanik, Institut für Botanik

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie

Rekombinante Synthese organischer Verbindungen in Cyanobakterien

1. Stand der Forschung

1.1 Einleitung

Der Begriff Alge bezeichnet aquatisch lebende Organismen, die zu oxygener Photosynthese befähigt sind. Mikroalgen sind im Gegensatz zu Makroalgen mikroskopisch kleine Lebewesen, die aus einzelnen oder wenigen Zellen bestehen. Je nach Definition werden die eukaryotischen Mikroalgen von den prokaryotischen Cyanobakterien abgegrenzt oder beide Gruppen zusammengefasst. Mikroalgen und Cyanobakterien stehen im Fokus der biotechnologischen Forschung, um die Produktion von Energieträgern, rekombinanten Proteinen oder wertvollen Sekundärmetaboliten zu ermöglichen. Zu den üblicherweise favorisierten Energieträgern zählen Biodiesel, Ethanol, Wasserstoff und Biogas aus Algenbiomasse. Die Photosynthese liefert für die Produktion sowohl die energetische als auch die stoffliche Grundlage, indem sie Lichtenergie in chemische Energie umwandelt und CO₂ zum Aufbau der Energieträger (mit Ausnahme von Wasserstoff) fixiert.

1.2 Mikroalgen als Energieträger

Ein wesentlicher Teil der heutigen Energieversorgung wird nach wie vor durch fossile Energieträger gewährleistet. Außerdem ist Erdöl ein Rohstoff für viele Kunststoffe, Tenside und Arzneimittel. Alle fossilen Energiespeicher sind endlich, daher bedarf es nachhaltiger Alternativen. Bereits heute werden aus Nutzpflanzen Biokraftstoffe hergestellt. Dies ist zwar erneuerbar und CO₂-neutral (oder zumindest klimaschonender als die Verwendung fossiler Energieträger), führt aber zu einer Konkurrenz um Ackerland zwischen Energiepflanzen und Nahrungs- sowie Futtermitteln und damit zu einem Preisanstieg als auch zur Rodung von Regenwäldern. Die Anzucht von Mikroalgen ist hingegen nur von den Umweltfaktoren Sonneneinstrahlung, Temperatur, der Verfügbarkeit von Wasser und nicht von der Bodenqualität abhängig. Je nachdem, welche Mikroalge kultiviert wird, kann der ausgewählte Organismus auch in Salz- oder Abwasser wachsen, deutlich höhere Wachstumsraten als Landpflanzen aufweisen und/oder gentechnisch modifizierbar sein, sodass eine Vielzahl von organischen Verbindungen produziert werden kann. Zudem entfallen einige Arbeitsschritte, wenn sowohl CO₂-Fixierung als auch die Produktion des Kraftstoffes in demselben Organismus stattfinden, die z.B. bei der Gewinnung von Ethanol auf Mais anfallen würden. Daher ist die Produktion von Energieträgern durch Mikroalgen umweltfreundlicher und potentiell effizienter als die Produktion durch die Verwendung von Pflanzen. Durch die Verwendung geschlossener Bioreaktoren zur Algenkultivierung tritt außerdem nicht das Problem auf, gentechnisch veränderte Organismen in der Umwelt freisetzen zu müssen und es kann CO₂, das in großtechnischen Prozessen freigesetzt wird, als Kohlenstoffquelle verwendet werden.

1.3 Cyanobakterien

Die Vorfahren der heutigen Cyanobakterien waren die ersten photoautotrophen Organismen, die oxygene Photosynthese betrieben. Damit veränderten sie das Bild der Erde nachhaltiger als jede andere Lebensform, indem sie atmosphärischen Sauerstoff bildeten und damit die Grundlage für komplexeres Leben legten. Auch heute sind Cyanobakterien noch wichtige Primärproduzenten und setzen ungefähr 40% der primären Biomasse der Meere um. Außerdem sind Cyanobakterien die Vorläufer der Plastiden, welche die Photosynthese in Algen und Pflanzen ermöglichen. Prominente Vertreter der Cyanobakterien sind *Anabaena*, eine Gattung, die elementaren Stickstoff fixieren kann, *Synechococcus* und *Synechocystis*, zwei Modellorganismen, wobei *Synechocystis* das erste photosynthetisch aktive Lebewesen war, dessen Genom sequenziert wurde, sowie *Arthrospira* und *Phormidium*, die zur Ordnung der Oscillatoriales gehören. *Phormidium* weist ein schnelles, filamentöses Wachstum auf. Die Vermehrung erfolgt über Hormogonien, kurze Filamente, die durch den Abbruch oder die Auflösung größerer *Phormidium*-Filamente entstehen. Anders als *Synechococcus* und *Synechocystis* wird *Phormidium* noch nicht in der Biotechnologie eingesetzt. Allerdings findet *Arthrospira*, besser bekannt unter dem früheren und im Handel immer noch gebräuchlichen Namen *Spirulina*, schon als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung.

1.4 Synthese organischer Verbindungen in Mikroorganismen

Die biotechnologische Herstellung von organischen Verbindungen hat eine lange Tradition. Das prominenteste Beispiel ist die alkoholische Gärung durch *Saccharomyces cerevisiae* unter Sauerstoffmangel. Neben diesem Beispiel für die natürliche, biologische Synthese von Ethanol gibt es auch die Möglichkeit Ethanol durch einen künstlich in Organismen eingebrachten Stoffwechselweg zu erzeugen.

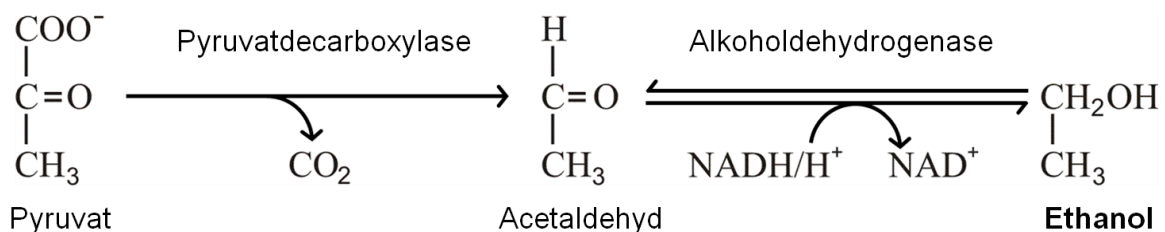


Abbildung 1: Die Synthese von Ethanol ausgehend von Pyruvat

Von Pyruvat, einer zentralen Stoffwechselverbindung, wird durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC) CO₂ abgespalten. Durch diesen irreversiblen Schritt entsteht Acetaldehyd. Acetaldehyd wird durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Ethanol reduziert. Reduktionsäquivalent bei dieser Reaktion ist NADH, welches zu NAD⁺ oxidiert wird (Abbildung 1). Deng und Coleman zeigten 1999, dass dieser Stoffwechselweg auch auf das Cyanobakterium *Synechococcus* übertragbar ist, so dass Sonnenenergie von einem Organismus direkt in Ethanol umgewandelt werden kann, ohne dass z.B. Kohlenhydrate als Energie- und Kohlenstoffquelle notwendig waren. In den darauffolgenden Jahren wurde die Ethanolproduktion in den Modellorganismen *Synechococcus* und *Synechocystis* weiter optimiert und die Firma Algenol

(USA) war die erste, die mit Hilfe dieser Organismen die Ethanolproduktion in Cyanobakterien kommerziell zu realisieren versuchte.

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll an der Erzeugung von Energieträgern durch Cyanobakterien gearbeitet werden. Das Ziel ist letztendlich, Sonnenenergie zu verwenden um einen Kraftstoff oder andere nützliche Produkte herzustellen, sodass der Hauptteil der Energie aus dem Sonnenlicht stammt. Dieses Konzept versuchen bereits verschiedene Arbeitsgruppen zu realisieren oder haben dies bereits realisiert. Hier soll es in erster Linie um die Verwendung von *Phormidium* für die Produktion von Ethanol und anderer organischer Verbindungen gehen. Die hierfür verwendeten Stämme wurden in Rockpools isoliert. Rockpools sind kleine Tümpel in Meeresnähe, die ihr Wasser durch Tidenhub und Spritz- und Sprühwasser aber auch durch Niederschlag beziehen. Dadurch herrschen in Rockpools stark fluktuierende Salzkonzentrationen und große Temperaturschwankungen. Das biotechnologisch noch nicht eingesetzte, filamentös wachsende *Phormidium* ist daher robust, wächst gleichzeitig schnell und auch bei intensiver Belichtung und weist somit möglicherweise ein höheres Potential auf als einzellige *Synechocystis*- oder *Synechococcus*-Arten. Die molekularbiologische Erschließung dieser Gattung kann daher das Potential von Cyanobakterien in der biotechnologischen Anwendung erhöhen. *Phormidium* wächst bevorzugt an Oberflächen. Dies kann gegenüber den bislang biotechnologisch eingesetzten, planktisch lebenden Cyanobakterien mehrere potentielle Vorteile bieten. So sind Produkte wahrscheinlich leichter aufzureinigen und Medien einfacher zu wechseln. Auch die effiziente Versorgung mit Licht und CO₂ könnte leichter zu handhaben sein. Zudem wurde die generelle Möglichkeit der Kultivierung in Bioreaktoren bereits mit positivem Ergebnis überprüft. Allerdings müssen noch Bioreaktoren entwickelt werden, die für die Kultivierung von filamentösen Cyanobakterien optimiert sind.

Für die Produktion von Ethanol werden die PDC und ADH in Cyanobakterien überexprimiert. Erstes Ziel dieser Arbeit ist es daher die stabile genetische Transformation von *Phormidium* zu etablieren und eine effiziente, heterologe Expression zu ermöglichen um somit die Ethanolsynthese in *Phormidium* zu ermöglichen. In weiterführenden Versuchen wird die Ethanolproduktion durch die Kultivierung von *Phormidium* im Bioreaktor und durch metabolische Optimierung weiter verbessert werden. Gegenfalls lassen sie Erkenntnisse aus der Ethanolproduktion auf die Synthese anderer Verbindungen in *Phormidium* übertragen.

3. Vorarbeiten

Mehrere *Phormidium*-Stämme, die auf Exkursionen gesammelt wurden, liegen in Reinkultur vor. Von einem Stamm, HE10JO, ist das Genom sequenziert und analysiert. Das Wachstum der *Phormidium*-Stämme wurde unter verschiedenen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur) charakterisiert und ihre generelle Kultivierbarkeit in einem Bioreaktor bestätigt.

4. Stand der Arbeit und Ausblick

4.1 Transformation von *Phormidium*

Für die Transformation von *Phormidium* wurde in verschiedene homologe Sequenzen die Resistenzkassette gegen das Antibiotikum Kanamycin kloniert (Abbildung 2a). Zellen, die mit dieser Sequenz durch Elektroporation transformiert wurden, wiesen eine Resistenz gegen Kanamycin auf und die Integration des Kanamycin-Resistenzgens in das *Phormidium*-Genom wurde mittels PCR nachgewiesen. Für den Stamm HE10JO wurden hier eine Resistenz bis einschließlich einer Konzentration von 20 mg/ml Kanamycin gemessen (Abbildung 2b). Die Transformation konnte auch bei zwei nahe verwandten Stämme GI09CO und HE10DO erfolgreich durchgeführt werden. Hiermit ist die essentielle Grundlage für alle weiteren Schritte dieser Arbeit geschaffen, indem eine Methode etabliert wurde um *Phormidium* stabil über homologe Rekombination zu transformieren.

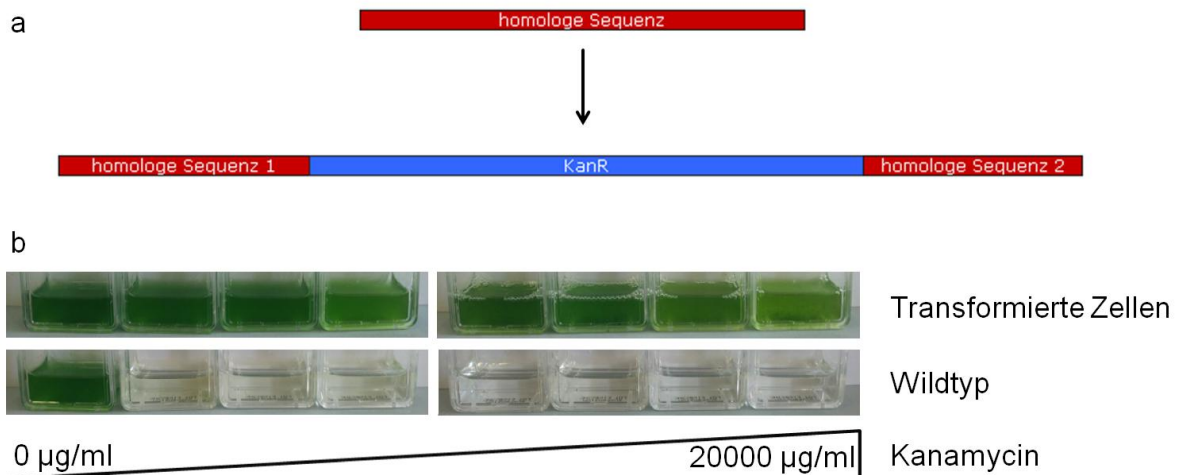


Abbildung 2: Transformation von *Phormidium*.

- In die Sequenz aus dem *Phormidium*-Genom, welche die homologe Rekombination ermöglichen (rot), wurde das Kanamycin-Resistenzgen (blau) kloniert.
- Kanamycin-Resistenz von transformierten Zellen im Vergleich zum *Phormidium*-Wildtyp.

Ein Ansatzpunkt für weiterführende Experimente ist die Verbesserung des Transformationsprotokolls. Zum Beispiel kann die Zerkleinerung der Zellfäden der filamentös wachsenden *Phormidium*-Stämme vor der Transformation optimiert oder die Verwendung von verbessertem Medium erprobt werden. Auch können verschiedene Zielsequenzen für die homologe Rekombination getestet werden. Bislang wurde die Sequenz eines Hydrogenasegens verwendet, welches für ein Enzym codiert, das nicht überlebensnotwendig für *Phormidium* ist.

4.2 Etablierung der Ethanol synthese

Für die Ethanol synthese müssen die beiden Enzyme PDC und ADH in *Phormidium* gebildet werden. Um eine möglichst gute Expression zu ermöglichen wird zunächst die Expression des Markerproteins GFP (grün fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle verschiedener Promotoren und Terminatoren untersucht, da nicht bekannt welche genetischen Elemente in *Phormidium* eine möglichst gute Genexpression

ermöglichen (Abbildung 3). Momentan werden gerade diese genetischen Konstrukte für die GFP-Expression erstellt.



Abbildung 3: Design zum Testen verschiedener Promotoren und Terminatoren. Promotor: orange, GFP: grün, Terminator: gelb, Kanamycin-Resistenzgen: blau, homologe Sequenzen: grau

Es werden entweder Promotoren und Terminatoren verwendet, die in *Synechocystis* bereits mit hohen Expressionsraten charakterisiert wurden, oder native Promotoren aus *Phormidium*, von denen angenommen wird, dass sie eine hohe Aktivität vermitteln. Die Promotoren und Terminatoren, die die vielversprechendsten Ergebnisse in der GFP-Expression zeigen, werden anschließend für die Expression von PDC und ADH verwendet werden.

4.3 Weiterführende Versuche

Wenn Ethanol-produzierende Klone vorliegen, gibt es mehrere Ansätze für das weitere Vorgehen.

Metabolische Optimierung: Unter 4.2 werden nicht nur besonders starke sondern auch regulierbare Promotoren getestet werden. So wäre es eventuell möglich von einer Wachstumsphase der Kultur in eine Produktionsphase umzuschalten. Neben der optimalen Menge an PDC und ADH kann die in Abbildung 1 dargestellte Reaktion auch verbessert werden, indem die Menge an Reduktionsäquivalent erhöht wird. Dies kann durch die Verwendung von NADPH-abhängigen ADHs oder die Coexpression von NADPH/NADH-Transhydrogenasen geschehen. Dies ist so, weil das bei der Photosynthese erzeugte NADPH bei Cyanobakterien in wesentlich höheren Mengen vorliegt als NADH. NADPH/NADH-Transhydrogenasen können Elektronen und Protonen von NADPH auf NADH und umgekehrt übertragen. Pyruvat, die Ausgangsverbindung für die Ethanolsynthese, ist ein zentrales Stoffwechselprodukt, das von vielen Reaktionswegen weiterverarbeitet wird. Wenn man diese konkurrierenden Reaktionswege teilweise oder vollständig inhibiert, kann das die Ethanolproduktion verstärken. Dies kann sich allerdings negativ auf Viabilität von *Phormidium* auswirken.

Bioreaktor: Um die Ethanol-Ausbeute zu erhöhen ist mittel- und langfristig die Kultivierung in speziell für *Phormidium* konstruierten Bioreaktoren notwendig. Hierfür muss das Design der Bioreaktoren auf das filamentöse Wachstum von *Phormidium* angepasst werden.

Synthese anderer Verbindungen: Die Ethanolsynthese in das Modell, mit welchem das Potential von *Phormidium* für die Biotechnologie bestimmt werden soll. Allerdings sind mit der Etablierung der kontrollierten Genexpression in *Phormidium* die Synthese vieler unterschiedlicher Verbindungen denkbar. Das fängt mit ähnlichen, kleinen Verbindungen wie Lactat oder verschiedenen Alkoholen und Aldehyden an, welche aus dem Aminosäurestoffwechsel abgeleitet werden können und kann bis zur Produktion vom Biopolymeren gehen.