

Univ.-Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Systembiotechnologie
Universität des Saarlandes
Campus Gebäude A 1 5
66123 Saarbrücken

Systembiotechnologische Optimierung von *Escherichia coli* zur Herstellung von Violacein (Abschlussbericht Max-Buchner-Forschungsprojekt 2024)

1. Aufgabenstellung

Im geplanten Projekt sollte mit Hilfe moderner Methoden der Systembiotechnologie das Bakterium *Escherichia coli* zu einem effektiven Produktionsstamm für die fermentative Herstellung von Violacein und verwandten Derivaten entwickelt und optimiert werden. Violacein ist ein violettes Pigment, dessen dimere Struktur durch Kondensation aus zwei Tryptophan-Molekülen gebildet wird (Sanchez et al. 2006). Es ist durch seine breite biologische Wirkung von großem Interesse als potentieller Wirkstoff und wirkt nachweislich gegen Tumore, Viren sowie pathogene Bakterien wie *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Neisseria* und *Pseudomonas*. Dazu sind antiulzerogene, antifungale, antioxidative sowie immunomodulatorische, analgetische und antipyretische Wirkungen beschrieben (Duran et al. 2007). Für die komplexe Synthese bietet sich insbesondere die biotechnologische Herstellung an. Pathogene Mikroorganismen wie *Duganella* oder *Chromobacterium*, die natürlicherweise über Synthesewege für Violacein verfügen, eignen sich jedoch aufgrund ihrer Sicherheitsklassifizierung in Stufe S2, einer vergleichsweise schlechten Kultivierbarkeit und einer schlechten genetischen Zugänglichkeit jedoch nicht oder nur sehr bedingt für den Einsatz als biotechnologische Produktionsorganismen, so dass großes Interesse an alternativen Produktionssystemen besteht (Yada et al. 2008).

2. Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt wurde von Herrn Andre Rodrigues als Max-Buchner-Stipendiaten das Bodenbakterium *Escherichia coli* zielgerichtet zu einem maßgeschneiderten Produktionsstamm für die Antitumorwirkstoffe Violacein und Desoxyviolacein optimiert. Es

wurde zunächst eine HPLC-Methode für Violacein und Deoxyviolacein entwickelt, die eine simultane, exakte Quantifizierung beider Stoffe in Fermentationsüberständen ermöglicht. Dies stellte eine wichtige Grundlage für die weiteren Arbeiten dar, da die bis dahin verfügbare, photometrische Methode keine Auflösung der Derivate erlaubte und zudem recht ungenau war. Dabei gelang es auch, die Struktur der gebildeten Produkte eindeutig zu belegen (NMR, LC-MS). Ausgangspunkt der Stammoptimierung war im Folgenden ein in Vorarbeiten geschaffener Basisstamm von *E. coli*, der das heterologe Gencluster *vioABCE* aus *Chromobacterium violaceum* unter der Kontrolle des induzierbaren *araC* System exprimiert (Abb. 2 A und B).

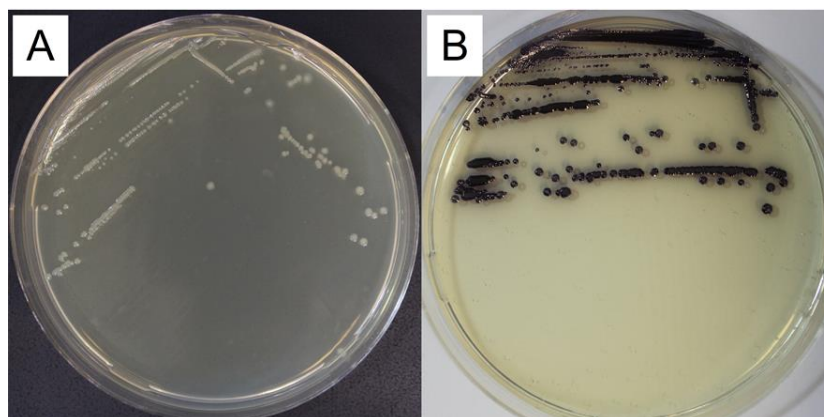


Abb. 2: Kontrolle der Deoxyviolacein-Produktion in *E. coli* dVio-1 über das AraC-System mit L-arabinose als Induktor der Expression von *vioABCE*: Wachstum auf Komplex-Medium mit Kanamycin und abgeschalteter Synthese (A) sowie mit Kanamycin und L-arabinose unter Bildung des violetten Antitumorwirkstoffes (B). Die Daten sind entnommen aus Rodrigues et al. (2013)

Dieser Stamm akkumulierte nach einer ersten Optimierung von Kulturmedium und Prozessführung 180 mg L⁻¹ Desoxyviolacein. Gezielte intrazelluläre Stoffwechselanalysen identifizierten dann Engpässe in den zuliefernden Routen der Biosynthese von Tryptophan, dem zentralen Baustein für das Produkt. Dieses Wissen wurde für die rationale Stammoptimierung genutzt. Ziel dieser systembiologischen Arbeiten war die verbesserte Bereitstellung des Violacein-Bausteins Tryptophan sowie des ebenfalls benötigten Kofaktors NADPH. Nach einem mehrwöchigen, erfolgreichen Forschungsaufenthalt von Herrn Rodrigues in der Arbeitsgruppe von Prof. Sprenger an der Universität Stuttgart wurde die Stammoptimierung in enger Kooperation beider Arbeitsgruppen weitergeführt. Dabei wurde sowohl die Überexpression als auch die Feedback-De-Regulation von Schlüsselenzymen der Tryptophan-Synthese in geeigneten Produktionsstämmen vorgenommen, die direkt den

Baustein für die Zielprodukte liefern. Zudem wurde über eine verstärkte Expression der Transketolase eine Amplifikation des Pentose-Phosphat-Weges erreicht, um verstärkt NADPH bereitzustellen. Durch die aufeinanderfolgende Optimierung von Serin-, Tryptophan- und Chorismat-Biosynthese sowie des nicht-oxidativen Pentose-Phosphat-Weges konnte eine umfassende Optimierung des Stoffflusses zum Zielprodukt erreicht werden (Abb. 2).

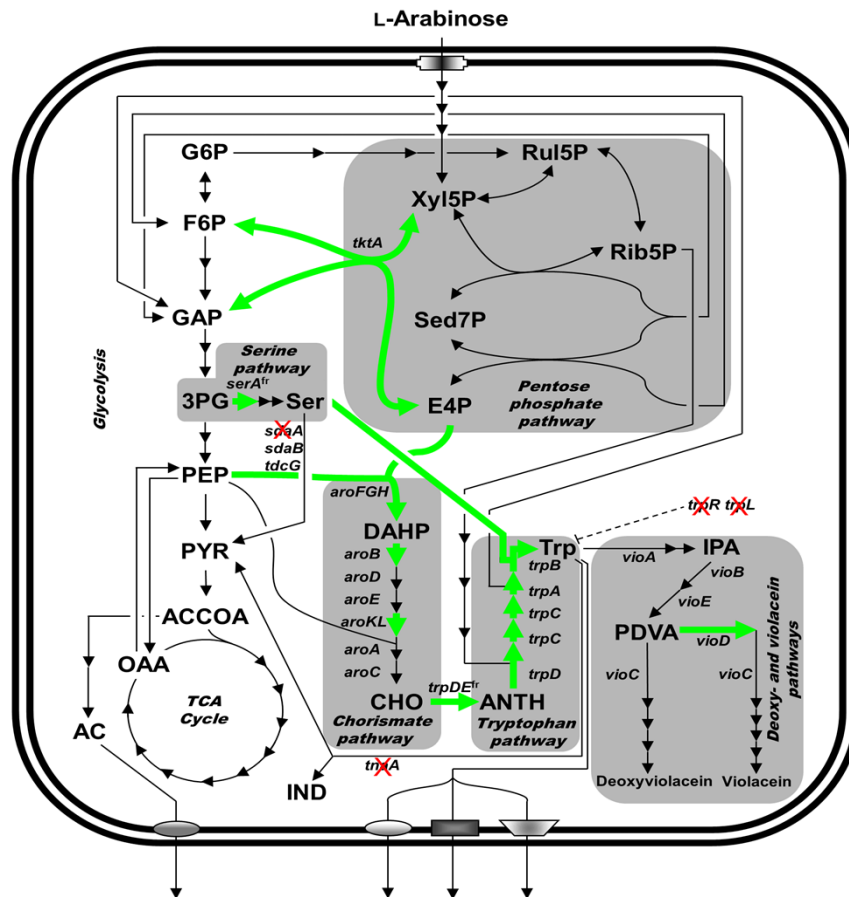


Abb. 2: Systems Metabolic Engineering zur Produktion von Violacein und Desoxyviolacein in *Escherichia coli* (Rodrigues et al. 2013). Grüne Pfeile markieren Reaktionen, die durch Überexpression der kodierenden Gene und Deregulierung von Feedbackmechanismen verstärkt wurden. Entfernte Reaktionen durch Gen-Deletion sind rot markiert. Bezeichnungen: G6P (Glucose-6-Phosphat), F6P (Fructose-6-Phosphat), GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat), 2PG (2-Phosphoglycerat), PEP (Phosphoenolpyruvat), PYR (Pyruvat), AcCoA (Acetyl-CoA), OAA (Oxalacetat), IND (Indol) Rul5P (Ribulose-5-Phosphat), Xyl5P (Xylulose-5-Phosphat), Rib5P (Ribose-5-Phosphat), Sed7P (Sedoheptulose-7-Phosphat), E4P (Erythrose-4-phosphat), Ser (Serin), DAHP-(3-Desoxy-d-arabinoheptuloson-7-phosphat), CHO (Chorismat) ANTH (Anthranilatsynthase), Trp (Tryptophan), IPa (Indol-3-Brenztraubensäure-imin), PDVA (Protodeoxyviolaceinsäure) und AC (Acetat).

Insgesamt wurde auf diesem Wege die Produktion im Stamm *E. coli* DVIO-6 in Schüttelkolbenkulturen auf 320 mg L^{-1} Desoxyviolacein gesteigert. Das metabolische Chassis von *E. coli* mit einem High-Flux-Tryptophan-Weg wurde durch genomische Integration des *vioD* Genes aus *Janthinobacterium lividum* zur gezielten Produktion von Violacein weiterentwickelt.

In einem Fed-Batch-Verfahren akkumulierte der Produzent *E. coli* Vio-4 bereits 710 mg L^{-1} des gewünschten Produktes. Über eine Extraktion aus der Kulturbrühe und anschließende Kristallisation konnte Violacein mit 99,8% Reinheit erhalten werden (Abb. 3 A und B). Die Ergebnisse setzen einen Meilenstein in der biobasierten-Synthese der Antitumorwirkstoffe Violacein und Desoxyviolacein und zeigen darüber hinaus das große Potential von *E. coli* als Plattform für die Produktion Tryptophan-basierter Therapeutika. Weitere Details zu den durchgeführten Arbeiten können den daraus hervorgegangenen Publikationen (Rodrigues et al. 2012, Rodrigues et al. 2013) entnommen werden. Der Max-Buchner-Stiftung sei an dieser Stelle für die Förderung der Arbeiten ausdrücklich gedankt.

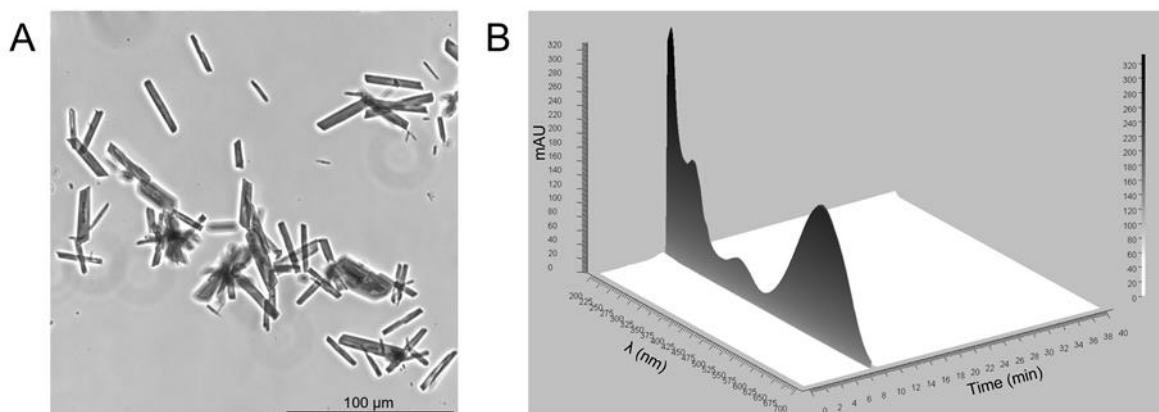


Abb. 3: Aufreinigung von Violacein: Kristallisiertes Violacein (A) und HPLC-Chromatogramm von Violacein nach Lösen der Kristalle in Ethanol (B). Die Daten sind aus Rodrigues et al. (2013) entnommen.

3. Wissenschaftliche Bedeutung und Nutzen für die chemische Technik, Verfahrenstechnik und Biotechnologie

Die Arbeiten zur metabolischen Analyse aber auch die rationale gentechnische Modifikation liefern wertvolle Daten für die systembiologische Modellierung von *E. coli* und leisten damit

einen wichtigen Beitrag zum metabolischen Verständnis dieser weltweit eingesetzten Zellfabrik. Das interdisziplinäre Projekt kombinierte eine Vielzahl bioanalytischer und molekularbiologischer Methoden mit Fermentationstechnologie und Prozess-entwicklung. Dies nutzte Herr Rodrigues, um eine breite Expertise moderner Techniken zu erlernen, wie sie in der akademischen und industriellen Forschung dringend benötigt werden. Vor dem Hintergrund einer Vielzahl von Krankheiten, die unsere Gesellschaft bedrohen, ist die effiziente Herstellung maßgeschneiderter Wirkstoffe eine der großen Herausforderungen für die Biotechnologie. Mit der erfolgreichen Entwicklung und Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von Violacein und wirksamer Derivate bietet sich nun die Möglichkeit, diese Wirkstoffe effizient und mit hoher Reinheit herstellen zu können.

Literaturverzeichnis

- Duran, N, GZ Justo, CV Ferreira, PS Melo, L Cordi und D Martins.2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol Appl Biochem* 48: 127-33.
- Rodrigues AL, Trachtmann N, Becker J, Lohanatha AF, Blotenberg J, Bolten CJ, Korneli C, de Souza Lima AO, Porto LM, Sprenger GA, Wittmann C. 2013. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. *Metab Eng.*20C: 29-41.
- Rodrigues AL, Göcke Y, Bolten C, Brock NL, Dickschat JS, Wittmann C. 2012. Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison. *Biotechnol Lett.*34:717-720.
- Sanchez, C, AF Brana, C Mendez und JA Salas.2006. Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *Chembiochem* 7: 1231-40.
- Yada, S, Y Wang, Y Zou, K Nagasaki, K Hosokawa, I Osaka, R Arakawa und K Enomoto.2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Mar Biotechnol (NY)* 10: 128-32.