

Abschlussbericht – Teil 1 Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung
e.V. für ihr Institut:
Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME,
Außenstelle Münster
Schlossplatz 8
48143 Münster
Leitung: Dr. Christian Schulze Gronover

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Förderkennzeichen: 031B0823A

Vorhabensbezeichnung: **Zielgerichtete Biosynthese von pharmazeutisch relevanten
Triterpenoiden (ASPIRANT)**

Laufzeit des Vorhabens: 01. Februar 2020 bis 31. Januar 2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren Dr.
Christian Schulze Gronover, Dr. Boje Müller und Jos Cox.

Inhaltsverzeichnis

I Kurzbericht 3

I_1. Aufgabenstellung 3

I_2. Ablauf des Vorhabens 3

I_3. Projektergebnis 4

I Kurzbericht

I_1. Aufgabenstellung

Die Initiative „MASSGESCHNEIDERTE BIOBASIERTE INHALTSSTOFFE FÜR EINE WETTBEWERBSFÄHIGE BIOÖKONOMIE“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) hatte zum Ziel durch den Einsatz moderner biotechnologischer und molekularbiologischer Verfahren und die hohe Selektivität biokatalytischer Prozesse biologische Produktionssysteme zu entwickeln, die sich durch ein neuartiges Substratspektrum, eine erhöhte Produktvielfalt oder eine hohe Produktionseffizienz auszeichnen. Biologische Ressourcen können so durch die Verlagerung komplexer und aufwändiger Synthese- bzw. Prozessstufen in biobasierte Produktionseinheiten als biochemische „Fabriken“ für die Erzeugung maßgeschneiderter Inhaltsstoffe hoher Qualität genutzt werden. Das Einsatzspektrum dieser Produkte reicht von Lebensmitteln und Medikamenten bis hin zu chemischen Komponenten für unterschiedlichste industrielle Produkte.

Besonderer Wert sollte auf eine integrierte systemische Vorgehensweise gelegt werden, die in ihrer Zielsetzung und Planung die gesamte Wertschöpfungskette berücksichtigt: von der nachhaltigen Erzeugung biobasierter Ressourcen mit maßgeschneiderten Inhaltsstoffen bis hin zu hochwertigen Produkten. Auf diese Weise sollen Synergien zwischen Wirtschaft und Wissenschaft erzeugt werden. Die Förderung stand grundsätzlich allen Wirtschafts- und Industriebranchen offen, in denen biobasierte Ressourcen Verwendung finden können. Maßgeschneiderte biobasierte Rohstoffe mit hoher Qualität haben das Potenzial, Zukunfts- bzw. Wachstumsmärkte zu begründen.

Das Projekt ASPIRANT fokussierte sich auf die zielgerichtete Biosynthese von pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden aus Pflanzen in Hefen. Dies ermöglicht sowohl den Nutzen biologischer Ressourcen als auch die Etablierung aufwändiger Synthesestufen.

I_2. Ablauf des Vorhabens

Die dem Projekt zugrundeliegenden Aufgabenstellung der „Zielgerichteten Biosynthese von pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden“ (ASPIRANT) wurde am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME), Außenstelle Münster, an der Technischen Universität München (TUM) und bei den Unternehmen Vivacell Biotechnolgy GmbH (VIV) und der Phytowelt GreenTechnologies GmbH (PHY) bearbeitet. Das Projekt war in vier Arbeitspakete (AP) gegliedert. AP1 diente des Upscales der Fermentation und des Downstream Processings auf Basis eines zuvor entwickelten Lupeol-produzierenden Hefestammes. AP2 verfolgte pharmazeutische Screenings von Triterpenoid-Mischungen und aufgereinigten Triterpenoiden. Im AP3 wurden auf Basis der Erkenntnisse von AP1 und AP2 weitere Stammentwicklungen vorgenommen um das Produktspektrum zu erweitern und Triterpenoide zu modifizieren. Schließlich zielte AP4 auf Koordination und Öffentlichkeitsarbeit im Sinne einer nachhaltigen Wissenschaftskommunikation ab.

Tabelle 1: Zeit- und Meilensteinplanung. Das IME war an allen Arbeitspaketen durch die Vorbereitung von Hefestämmen, Triterpenoid-Proben und Analytikaufgaben beteiligt. Besonderer Schwerpunkt des Instituts lag auf AP3 und AP4.

Arbeitspaket	2020				2021				2022				2023
	2-3	4-6	7-9	10 - 12	1- 3	4-6	7-9	10- 12	1-3	4-6	7-9	10- 12	1
AP1: Upscale der Fermentation und des Downstream Processings	Upscaling M1												
					Etablierung eines DSP								
									Produktmuster M3				
AP2: Pharmazeutische Screenings	Breites Screening				M2								
					Detailscreening M4								
AP3: Entwicklung von Hefen, die maßgeschneiderte Triterpenoide produzieren (Leitung IME)					Expression Enzyme								
					Erstellung metabolischer Profile								
					Metabolic Engineering								

AP4: Koordination und Öffentlichkeitsarbeit (Leitung IME)	Übergeordnetes Projektmanagement	
		Workshop M5

Der Zeitplan wurde trotz Verschiebungen von Einzelarbeiten durch die Covid19-Pandemie eingehalten.

I_3. Projektergebnis

Das Projekt „Zielgerichtete Biosynthese von pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden“ (ASPIRANT) wurde erfolgreich abgeschlossen. Entsprechend wurden die nachfolgenden Meilensteine und messbare Ergebnisse (Deliverables) erfüllt.

Liste der Meilensteine:

- M1: Produktion von Lupeol im größeren Maßstab
- M2: Prioritätenliste von Triterpenoidverbindungen von besonderem pharmazeutischem Interesse, bioaktive Triterpenoidverbindungen
- M3: Produktion von drei pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden in größerem Maßstab
- M4: Hochaktive Triterpenoide aus Hefe charakterisiert
- M5: Workshop mit potenziellen Industriepartnern zur Einführung maßgeschneiderter Triterpenoide (Hauptverantwortung IME)

Liste der messbaren Ergebnisse:

- D1: Lieferung von Lupeol-produzierendem Stamm durch IME (Hauptverantwortung IME)
- D2: Lieferung von mindestens 15 Verbindungen in einem Maßstab von mehr als 1 mg und einer Reinheit von mehr als 98% für das erste pharmazeutische Screening (Hauptverantwortung IME)
- D3: Lieferung von mindestens 10 g Triterpenoidmischungen (Hauptverantwortung IME)
- D4: Es werden mindestens 3 Kultivierungsprotokolle getestet. Das vielversprechendste Protokoll wurde hinsichtlich Medienzusammensetzung, Belüftung, Fütterungsstrategie und Fütterungsgeschwindigkeit, Temperatur und Dauer optimiert und geliefert.
- D5: Klone von 10 Oxidosqualencyclasen und 5 Enzymen der Triterpenoxidation und 5 Enzymen für die Glykosylierung (Hauptverantwortung IME)
- D6: Strategie der Hefeoptimierung basierend auf Stoffwechselprofilen (Hauptverantwortung IME)
- D7: Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion (Adsorption), chromatographische Messungen. Nach einer kritischen Bewertung der technisch-wirtschaftlichen Möglichkeiten wird ein Protokoll für die weiteren Arbeiten ausgewählt.
- D8: Liste der Bioaktivitätsdaten der gescreenten Terpenoide zur Auswahl der vielversprechendsten Kandidaten
- D9: Optimierter Hefestamm für die Triterpenoid-Oxidation (Hauptverantwortung IME)
- D10: Herstellung von 300 mg von 3 relevanten Verbindungen
- D11: Pharmazeutische Bewertung von Screenings, Liste der Bioaktivitätsdaten der ausgewählten und weiter charakterisierten in Hefe hergestellten Kandidaten
- D12: Hefestamm mit hoher Produktionsleistung (>100 µg/L) (Hauptverantwortung IME)
- D13: Alle Berichte gemäß dem Projektplan geliefert (Hauptverantwortung IME)

Abschlussbericht -Teil 2 Ausführliche Darstellung

Zuwendungsempfänger: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V. für ihr Institut:
Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME,
Außenstelle Münster
Schlossplatz 8
48143 Münster
Leitung: Dr. Christian Schulze Gronover

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Förderkennzeichen: 031B0823A

Vorhabensbezeichnung: **Zielgerichtete Biosynthese von pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden (ASPIRANT)**

Laufzeit des Vorhabens: 01. Februar 2020 bis 31. Januar 2023

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren Dr. Christian Schulze Gronover, Dr. Boje Müller und Jos Cox

Inhaltsverzeichnis

II Ausführliche Darstellung	3
II_1 Verwendung der Zuwendung mit detaillierter Ergebnisdarstellung	3
und Gegenüberstellung zu den vorgegebenen Zielen	3
AP1 Upscale der Fermentation und des Downstream Processings	3
AP2: Pharmazeutische Screenings	4
AP3: Entwicklung von Hefen, die maßgeschneiderte Triterpenoide produzieren	5
AP4: Koordination und Öffentlichkeitsarbeit	10
II_3. Notwendigkeit/Angemessenheit der geleisteten Arbeit	11
II_4. Verwertbarkeit der Ergebnisse (Verwertungsplan)	11
II_5. Im Projektzeitraum bekannt gewordene Fortschritte Dritter	11
II_6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	12

II Ausführliche Darstellung

II_1 Verwendung der Zuwendung mit detaillierter Ergebnisdarstellung

und Gegenüberstellung zu den vorgegebenen Zielen

AP1 Upscale der Fermentation und des Downstream Processings

Für das Upscaling der Lupeolproduktion wurden zwei Hefestämme mit unterschiedlichem Genotyp an Phytowelt geliefert. Dies umfasste den Hefestamm Genotyp 1, welcher in der IME-Publikation (Bröker et al. 2018) beschrieben ist, sowie einen darauf aufbauenden Hefestamm Genotyp 2 mit zusätzlicher Insertion in das endogene *Galactose10*-Gen, welche zu einer Triterpenoidexpression auch in Medium mit geringerer Galaktosemenge führen sollte. Bei Expressionsversuchen der beiden Hefestämme zeigte der Genotyp 1 eine höhere Lupeolproduktion, weshalb dieser für weitere Upscaling Versuche sowie das Downstream Processing von Phytowelt benutzt wird. Hierfür wurde zudem das vom IME entwickelte Protokoll zur Triterpenoidaufreinigung bereitgestellt. Aufbauend auf dem Hefestamm Genotyp 1 wurden im Laufe des Projekts zwei beta-Amyrin produzierende Hefestämme, sowie zwei Hefestämme entwickelt, welche tetrazyklische Triterpenoide produzieren und diese an Phytowelt geliefert. Dies umfasste einen Stamm in welchem zusätzlich vorhandene Auxotrophien genetisch repariert wurden, um eine höhere Wachstumsdichte zu erreichen. Des Weiteren wurde die Galaktose-abhängige Expression durch Ausschalten des *Galaktose80*-Gens aus diesem Stamm entfernt, was zur konstitutiven Expression der vom GAL-Promotor angetriebenen Gene führte. So konnte mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle eine sehr hohe OD₆₀₀ und eine hohe Konzentration des tetrazyklischen Triterpenoids in einem 10L-Fermenter erzielt werden. Dieser überstieg den in der Literatur beschriebenen Höchstwert um ein Vielfaches und ist somit eine neue Bestmarke für die Produktion des pharmazeutisch relevanten Triterpenoids (vgl. AP 2) in *S. cerevisiae*. Die Hefebiomasse wurde anschließend lyophilisiert (Abbildung 1A) und für das Downstream Processing dieser Mengen wurde verschiedene Extraktionsprotokolle mittels Accelerated Solvent Extraction (ASE) getestet, wobei Ethylacetat zu der höchsten Extraktion des Triterpenoids führte (Abbildung 1B). Die dabei erreichte Menge war geringer als die für kleinere Ansätze genutzte Methode mittels Schwingmühle. Die Verwendung der ASE ist jedoch für größere Ansätze besser geeignet, schneller durchgeführt und benötigt weniger Lösungsmittel.

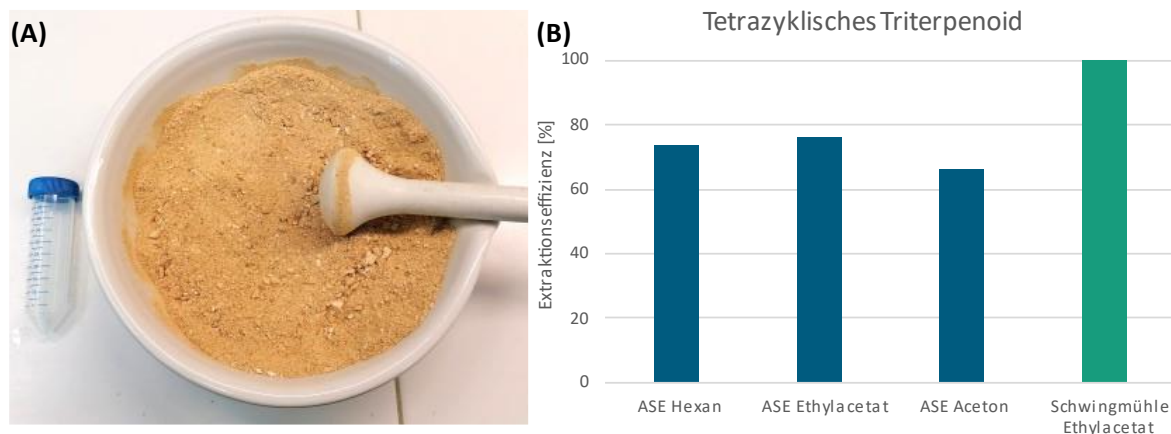


Abbildung 1: Produktion eines tetrazyklischen Triterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Lyophilisierte Hefezellen vor der Extraktion. (B) Vergleich der Triterpenoid Extraktionen mittels ASE und verschiedenen Lösungsmitteln, sowie mittels Schwingmühle.

Zur Entwicklung eines Downstream Processings wurden am Fraunhofer IME Triterpenoidmischungen von mindestens 10 Gramm hergestellt und an die Projektpartner geliefert. Darüber hinaus wurden vom IME verschiedene Strategien verfolgt, um Gene codierend für

Triterpenoid-modifizierende Enzyme mehrfach stabil in das Hefegenom zu integrieren und dadurch eine Fermentation zur Produktion von oxidierten Triterpenoiden sowie Saponinen zu erreichen.

Alle Meilensteine und messbaren Ergebnisse des Fraunhofer IME zum Arbeitspaket wurden erfüllt.

- M1: Produktion von Lupeol im größeren Maßstab
M3: Produktion von drei pharmazeutisch relevanten Triterpenoiden in größerem Maßstab
D1: Lieferung von Lupeol-produzierendem Stamm durch IME
D3: Lieferung von mindestens 10 g Triterpenoidmischungen

AP2: Pharmazeutische Screenings

Für das erste pharmazeutische Screening wurden 13 Triterpenoide am Fraunhofer IME gereinigt und in einem Maßstab von mehr als 1 mg an VivaCell gesendet (aufgelistet in Tabelle 1). Die Substanzen MS1 – MS11 wurden zudem ebenfalls an die TU München zur Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie geliefert. Darin enthalten sind für dieses Projekt interessante Triterpenoide und Triterpenoid-Saponine, welche natürlich in Löwenzahn, Ginseng, Efeu und Rosskastanie vorkommen. Auf Grund der Bioaktivitätsdaten der untersuchten Triterpenoide wurden im Rahmen des Projektes gezielt Hefen erstellt, welche neuartige Triterpenoide produzieren. Die Substanzen MS14 – MS18 wurden in 1 L Hefekulturen produziert, extrahiert und mittels HPLC aufgereinigt. Die Struktur und hohe Reinheit wurde mittels NMR-Spektroskopie vom Kooperationspartner TU München bestätigt. Mehr als 1 mg dieser Substanzen wurden an VivaCell für das pharmazeutische Screening geliefert.

Tabelle 1: Triterpenoide, welche an Phytowelt und die TU München verschickt wurden.

Bezeichnung	Typ	Menge
MS1	Saponin-Mix	1,7 mg
MS2	Saponin A	1,4 mg
MS3	Saponin B	1,7 mg
MS4	Triterpenoid A	1,7 mg
MS5	Triterpenoid-Keton	2,1 mg
MS6	Triterpenoid B	1,3 mg
MS7	Triterpenoid C	2 mg
MS8	Triterpenoid D	2,3 mg
MS9	Triterpenoid E	1,9 mg
MS10	Acetyliertes Triterpenoid	1,6 mg
MS11	Saponin C	3,3 mg
MS12	Undefinierte HPLC-Fraktion	>1 mg
MS13	Undefinierte HPLC-Fraktion	>1 mg
MS14	Oxidiertes Triterpenoid A	>1 mg
MS15	Oxidiertes Triterpenoid B	>1 mg
MS16	Oxidiertes Triterpenoid C	>2 mg
MS17	Triterpenoid F	>1 mg
MS18	Triterpenoid G	>1 mg
MS19	Triterpenoid H	>1 mg

Alle Meilensteine und messbaren Ergebnisse des IME zum Arbeitspaket wurden erfüllt.

- M2: Prioritätenliste von Triterpenoidverbindungen von besonderem pharmazeutischem Interesse, bioaktive Triterpenoidverbindungen
- M4: Hochaktive Triterpenoide aus Hefe charakterisiert
- D2: Lieferung von mindestens 15 Verbindungen in einem Maßstab von mehr als 1 mg und einer Reinheit von mehr als 98% für das erste pharmazeutische Screening

AP3: Entwicklung von Hefen, die maßgeschneiderte Triterpenoide produzieren

Zunächst wurden verschiedene Protokolle zur RNA-Extraktion aus den unterschiedlichen Pflanzen (Efeu, Ginseng, Rosskastanie, Mönchsfrucht) und Geweben (Blatt, Ranke, Samen) getestet. Mit der jeweils besten Methode wurde RNA isoliert und diese zu cDNA transkribiert, um von diesen Genen zu amplifizieren, welche an der Triterpenoidsynthese beteiligt sind. Dabei konnten Oxidosqualenzyklasten (OSCs), sowie NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen (CPRs) und Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) amplifiziert und anschließend in den optimierten Hefestamm transformiert werden. In ersten Expressionsversuchen konnten verschiedene Triterpenoide extrahiert und mittels GC-MS gemessen werden (Abbildung 2). Die Expression einer Ginseng-OSC führte zu der Produktion von Dammarendiol, eine Mönchsfrucht-OSC zu Cucurbitadienol, eine Efeu-OSC zu beta Amyrin und eine Löwenzahn-OSC zu Lupeol.

Im Folgenden wurden diese Hefen in größerem Maßstab kultiviert und die Triterpenoide mittels HPLC aufgereinigt. Mindestens 1 mg der noch nicht untersuchten Substanzen wurde an die Kooperationspartner zur Strukturanalyse und zum pharmazeutischen Screening geliefert.

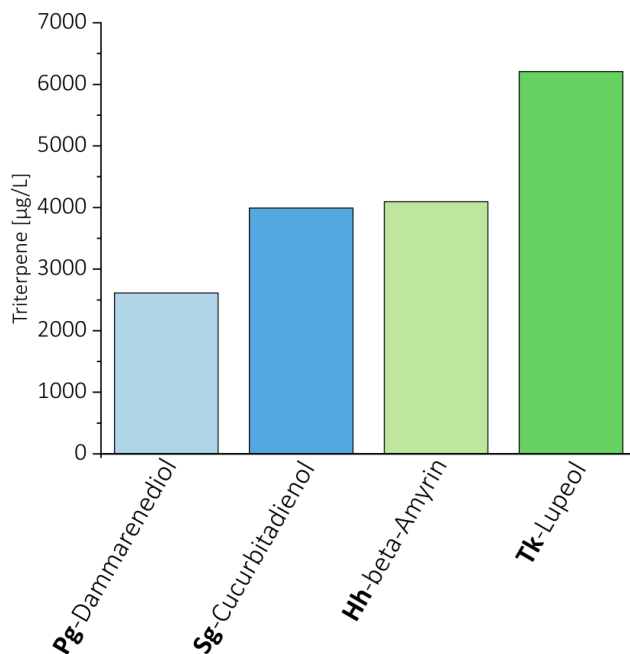


Abbildung 2: GC-MS Messung der Hefeextrakte. Die Hefen wurden kultiviert und die OSCs durch Galaktosezugabe induziert. Nach Induktion wurden die Hefen zentrifugiert, das Pellet extrahiert. Die OSCs wurden amplifiziert von Pg: *Panax ginseng*, Sg: *Siraitia grosvenorii*, Hh: *Hedera helix* und Tk: *Taraxacum koksaghyz*.

Aufbauend auf diese Triterpenoid-produzierenden Hefen wurden weitere Enzyme zur Triterpenoxidation zusätzlich transformiert. Dabei führte eine Efeu-CYP zu einer Oxidation am C28 des beta-Amyrins. Um das daraus resultierende Produkt, die Oleanolsäure, zu extrahieren wurden die Hefezellen nach dem Lyophilisieren mit einer Schwingmühle und Glaskugeln vermahlen und die Triterpenoide mit Essigsäureethylester extrahiert. Anschließend wurden die Triterpenoide silyliert und in der GC-MS gemessen. Wie in Abbildung 3 gezeigt, wurde beta-Amyrin von der Efeu-CYP über das Erythrodiol und Oleanolaldehyd in verschiedenen Stufen bis zur Oleanolsäure oxidiert. Durch die

Expression einer weiteren CYP aus Schneckenklee wurde Oleanolsäure am C23 ebenfalls in drei Stufen weiter oxidiert. Wobei von der ersten Oxidationsstufe, dem Hederagenin, am meisten vorlag. Die neu produzierten Substanzen Erythrodiol, Oleanolaldehyd und Oleanolsäure wurden in größerem Maßstab produziert und in mehreren Schritten mittels HPLC aufgereinigt und an TU München, sowie VivaCell geliefert. Hederagenin ist das direkte Vorläufermolekül des alpha-Hederins, einem Triterpenoid-Saponin, welches natürlich in der Efeupflanze vorkommt und in den pharmazeutischen Screenings des Kooperationspartners VivaCell eine entzündungshemmende Wirkung gezeigt hat

Die Efeu-CYP oxidiert nicht nur am C28 des beta-Amyrins, sondern ebenso mit Lupeol als Substrat. Das daraus resultierende Triterpenoid Betulinsäure zeigte jedoch nur einen geringen Effekt auf die von VivaCell untersuchten Cyto- und Chemokine, weshalb im weiteren Projektverlauf der Fokus auf Triterpenoide und Triterpenoid-Saponine mit beta-Amyrin als Grundgerüst gelegt wird.

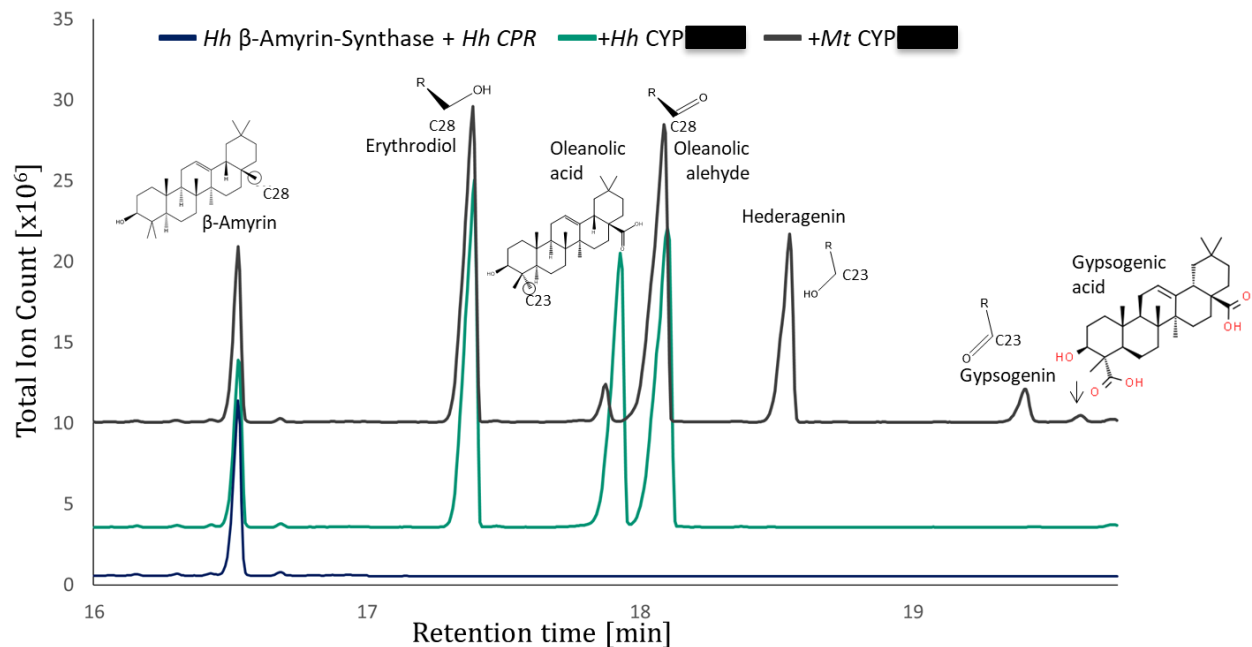


Abbildung 3: Oxidation von beta-Amyrin über Oleanolsäure zu Hederagenin. GC-MS Chromatogramm der silylierten Extrakte von Hefen mit Efeu (*Hedera helix*)-OSC, Efeu-CPR ohne heterolog exprimierte CYP (blau), mit Efeu-CYP (grün) und mit Efeu- und Schneckenklee (*Medicago truncatula*)-CYP (grau). Die Hefen wurden in Medium kultiviert und die CYP-Expression durch Galaktosezugabe induziert. Die Hefen wurden nach drei Tagen geerntet, das Zellpellet lyophilisiert und die Triterpenoide mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Efeu-CYP oxidierte beta-Amyrin am C28 in drei Oxidationsschritten bis zur Carbonsäure. Die Schneckenklee-CYP oxidierte Oleanolsäure am C23, wobei die erste Oxidationsstufe (Hederagenin) am meisten produziert wurde.

Bei der Produktion von oxidierten Triterpenoiden in Hefe ist die Bereitstellung und Übertragung von Elektronen auf die Cytochrom P450 Monooxygenase einer der limitierenden Faktoren. Dabei ist das Zusammenspiel von CPR und CYP entscheidend. In der Literatur ist beschrieben, dass pflanzliche CYPs eine höhere Oxidationsrate mit pflanzlichen CPRs aufweisen. Deshalb wurden zwei publizierte CPRs amplifiziert, im Hefestamm mit der Efeu-CYP exprimiert und die Oxidationsrate mit einer neuartigen CPR aus Efeu verglichen. Wie in Abbildung 4 gezeigt, war der Ertrag aller drei Oxidationsstufen mit CYP und CPR aus derselben Pflanzenart am höchsten.

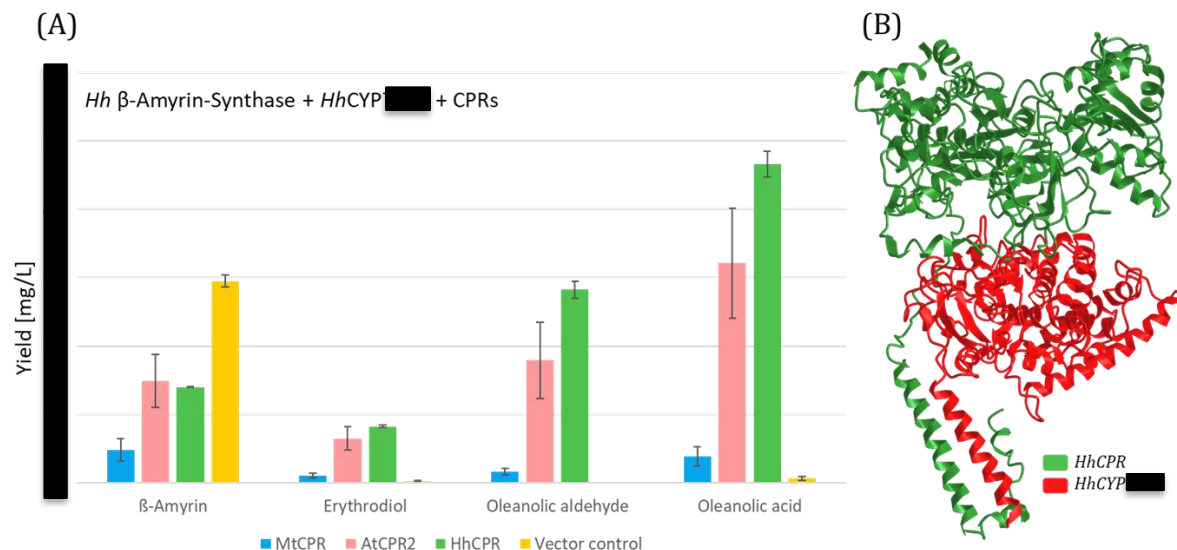


Abbildung 4: Zusammenspiel von Cytochrom P450 Monooxygenase und Reduktase. (A) Ertrag der Triterpenoide oxidiert durch die Efeu (*Hedera helix*)-CYP co-exprimiert mit Efeu-CPR im Vergleich mit in der Literatur beschriebenen, pflanzlichen CPRs (*Arabidopsis thaliana* und *Medicago truncatula*). Die Hefen wurden in Medium wie oben beschrieben kultiviert, die Triterpenoide extrahiert und mittels GC-MS quantifiziert. **(B)** Vorhersage der Struktur des Proteinkomplexes der Efeu-CYP und CPR durch AlphaFold2.

Die vorhergesagte Proteinstruktur der Efeu CYP diente als Ausgangspunkt zum gezielten Design neuartiger Enzym-Varianten. Mit dem online Tool zum Docking von Protein und Liganden 'EDock' (Zhang *et al.* 2020) wurden die Lage der Hämgruppe (Abbildung 5A) oder der Terpenoide im aktiven Zentrum des Enzyms simuliert. Auf Grund der hier vorhergesagten interagierenden Aminosäuren, sowie Vergleiche mit anderen CYPs der Familie 716A, wurden drei Stellen mutiert. Der Austausch der 'substrate restriction site 3' (SRS3) führte dabei nicht wie beabsichtigt zu einer höheren Produktion von Oleanolsäure (Abbildung 5B). Die Einzelaminosäureaustausche von Isoleucin zu Prolin an Position 214 sowie Glutamin zu Prolin an Position 360 führten gezielt zu einer signifikant höheren Produktion von Erythrodiol. Die beiden höheren Oxidationsstufen in Form von Oleanolaldehyd und -säure wurden hier jedoch ebenfalls produziert. Die Mutation beider Stellen führte zu einer Produktion von Erythrodiol als einzige Oxidationsstufe, wobei diese sogar etwas mehr produziert wurde als in der WT Variante. Durch ein gemeinsames Docking von Hämgruppe und Triterpenoid

sollen jetzt die interagierenden Aminosäuren besser identifiziert und anschließend modifiziert werden. Die Funktion weiterer Enzymvarianten soll im weiteren Projektverlauf überprüft werden

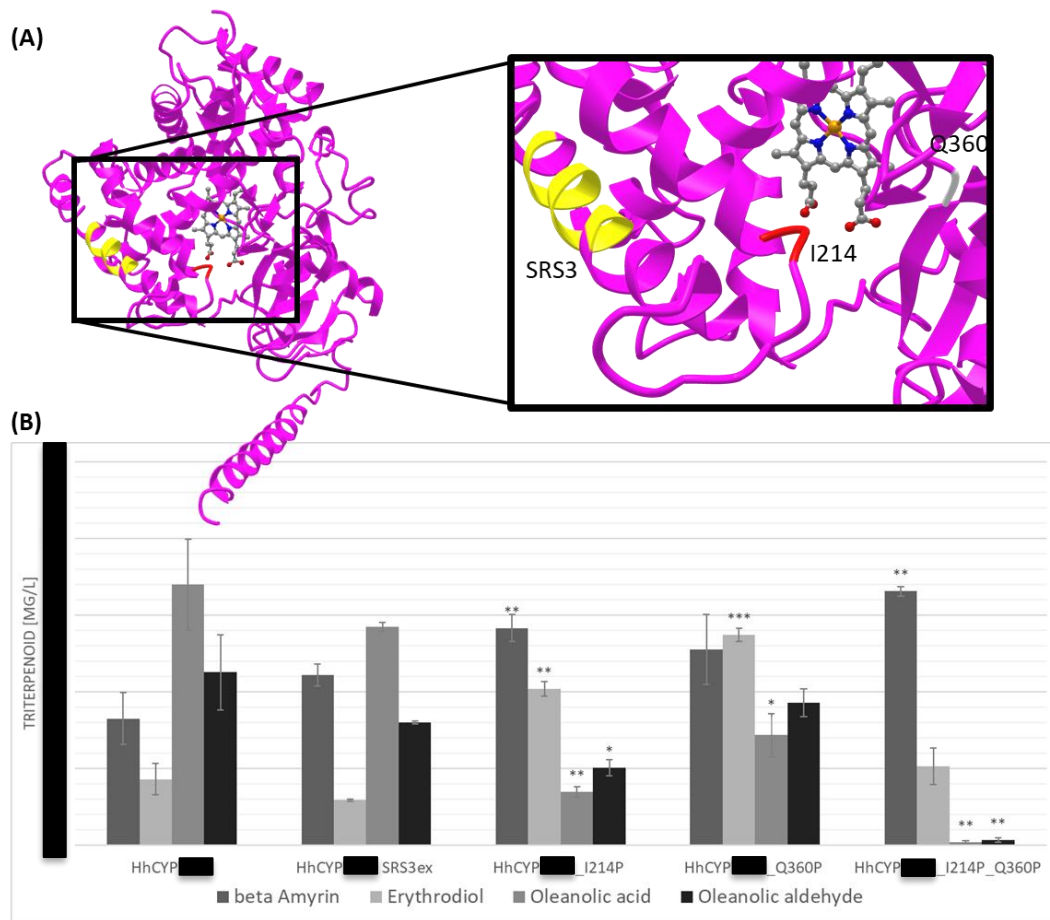


Abbildung 5: Erstellung neuer *HhCYP*-Enzymvarianten. (A) Vorhersage der Efeu CYP durch AlphaFold2 und Docking der Hämgruppe mittels EDock. Markierte Aminosäuren wurden ausgetauscht. (B) Vergleich der Triterpenoid Oxidation der Efeu WT-CYP und modifizierten Enzymvarianten exprimiert in 50 ml Hefekulturen und gemessen mittels GC-MS (n=3).

In dem von VivaCell durchgeführten pharmakologischem Screening zeigten Triterpenoid-Saponine den größten inhibierenden Effekt auf die untersuchten inflammatorischen Parameter und sind somit von hohem Interesse. Bei der Synthese von Saponinen werden durch UDP-Glykosyltransferasen (UGTs) Monosaccharide von UDP-Zuckern auf spezifische, oxidierte Stellen des Triterpenoids übertragen. Durch eine neuartige UGT aus Efeu konnte Oleanolsäure am C3 glykosyliert werden. Das daraus resultierende Oleanolsäure-3-O-glukosid konnte mittels LC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 6). Auch für diese Substanz wäre eine Biosynthese in größerem Maßstab und die Untersuchung des pharmakologischen Potentials denkbar. Der Ertrag von Triterpenoid-Saponinen in Hefe ist jedoch limitiert und benötigt weitere Stammoptimierungen. Strategien zur Erhöhung des UDP-Glukose Pools sowie der Synthese von UDP-Zuckern, welche natürlich nicht in der Bäckerhefe vorkommenden, werden aktuell vom IME getestet.

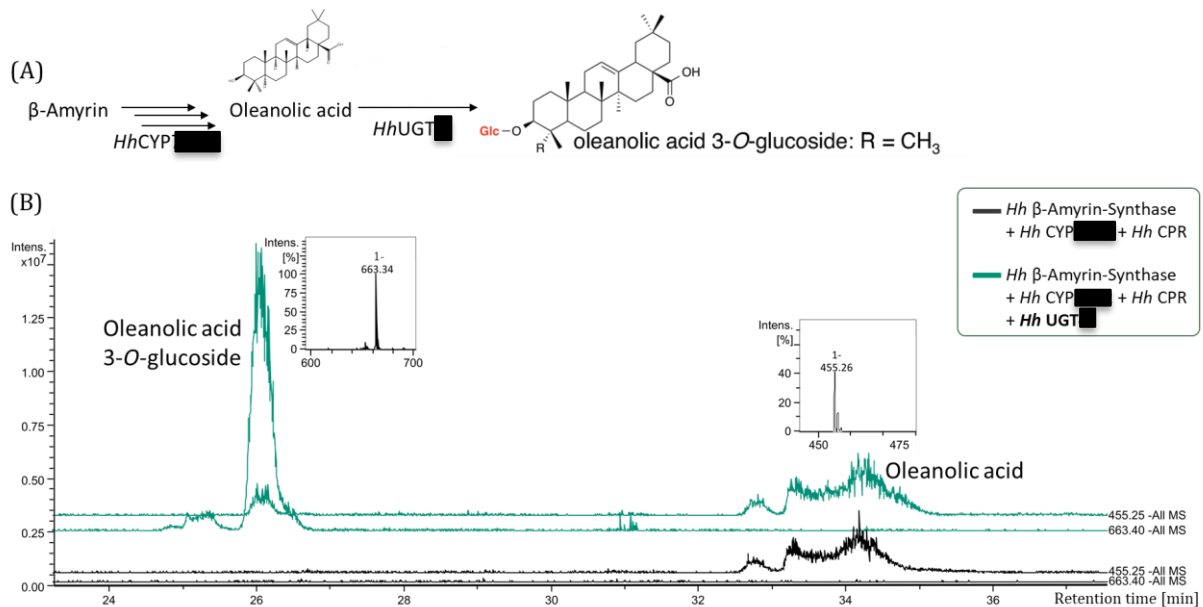


Abbildung 6: Glykosylierung von Oleanolsäure. (A) Schematische Darstellung des Synthesewegs von beta Amyrin zu Oleanolsäure-3-O-glucosid. (B) LC-MS Chromatogramm der substanzspezifischen Anionen von Oleanolsäure und Oleanolsäure-3-O-Glucosid der Extrakte von Hefen mit Efeu (*Hedera helix*)-OSC, CYP und CPR ohne (schwarz) und mit (grün) co-exprimierter Efeu-UGT. Die Hefen wurden in 50 ml Medium wie oben beschrieben kultiviert, die Triterpenoide extrahiert und mittels CG-MS quantifiziert.

Auf Grund der vielfach in der Literatur beschriebenen, pharmazeutischen Eigenschaften der Triterpenoide und Triterpenoid-Saponine aus Rosskastaniensamen, besteht ein besonderes Interesse maßgeschneiderte Hefen zu entwickeln, um diese Substanzen zu produzieren. Im Gegensatz zu anderen Pflanzen sind von der Rosskastanie kaum Gensequenzen oder das Genom veröffentlicht. Deshalb wurde hier zunächst eine mRNA-Sequenzierung angefertigt. Durch das Auswerten der Sequenzierungsdaten, konnten einige Gene die vermutlich für OSCs, CYPs, CPRs und UGTs codieren, identifiziert und von cDNA amplifiziert werden. Durch Expression in Hefe konnte eine Rosskastanien-OSC als beta-Amyrin-Synthase klassifiziert werden. Verglichen mit der beta-Amyrin-Synthase von Efeu zeigte die Synthase der Rosskastanie eine ähnliche Produktionsmenge an beta-Amyrin. Zudem konnte die Funktion einer Rosskastanien CPR bestätigt werden. Die CYPs der Rosskastanien zeigten keine Produktion in Hefe. Nachdem eine geringe Expression dieser Gene mittels Konfokalmikroskopie festgestellt wurde, wurden die vielversprechendsten Sequenzen codon-optimiert und -harmonisiert. Die Analyse der Funktion dieser CYP-Varianten, sowie der UGTs wird im weiteren Projektverlauf in Hefe überprüft.

Zur Erstellung von einem metabolischen Profil des tetrazyklischen Triterpenoids produzierenden Hefestammes wurden Kultivierungen in Triplikaten mit Isotop markierter Kohlenstoffquelle (Glukose [1-¹³C] oder Ethanol [U-¹³C₂]) oder organischer Stickstoffquelle (Glutamat ¹⁵N oder Glutamat [U-¹³C₅]) durchgeführt (Abbildung 7). Nach der Kultivierung wurden die Hefen abzentrifugiert, lyophilisiert, teilweise extrahiert und die Triterpenoide mittels GC-MS gemessen. Dabei wurde mit Glukose als Kohlenstoffquelle eine leicht höhere Triterpenoid Menge produziert als mit Ethanol. Das Triterpenoid wurde mittels HPLC aufgereinigt und zusammen mit dem Medium vor und nach der Kultivierung sowie einem Teil der lyophilisierten Hefepellets an die TUM zur NMR Spektroskopie gesendet. Die Auswertung der NMR Daten, die Beschreibung des metabolischen Zustandes, sowie dem Erstellen von Verbesserungsstrategien für die Fermentation und Stammoptimierung werden aktuell vom IME und TUM durchgeführt. Die Auswertung der Ansätze mit Isotop markiertem Glutamat indizieren eine Desaminierung des Glutamats aus dem Medium und eine erneute Aminierung aus anorganischem Stickstoff. Aus diesem Grund werden aktuell

Markierungsversuche mit $^{15}\text{NH}_4^+$ durchgeführt. Aufkommende Bottlenecks in der Triterpenoid Produktion sollen dadurch aufgedeckt und im weiteren Projektverlauf adressiert werden.

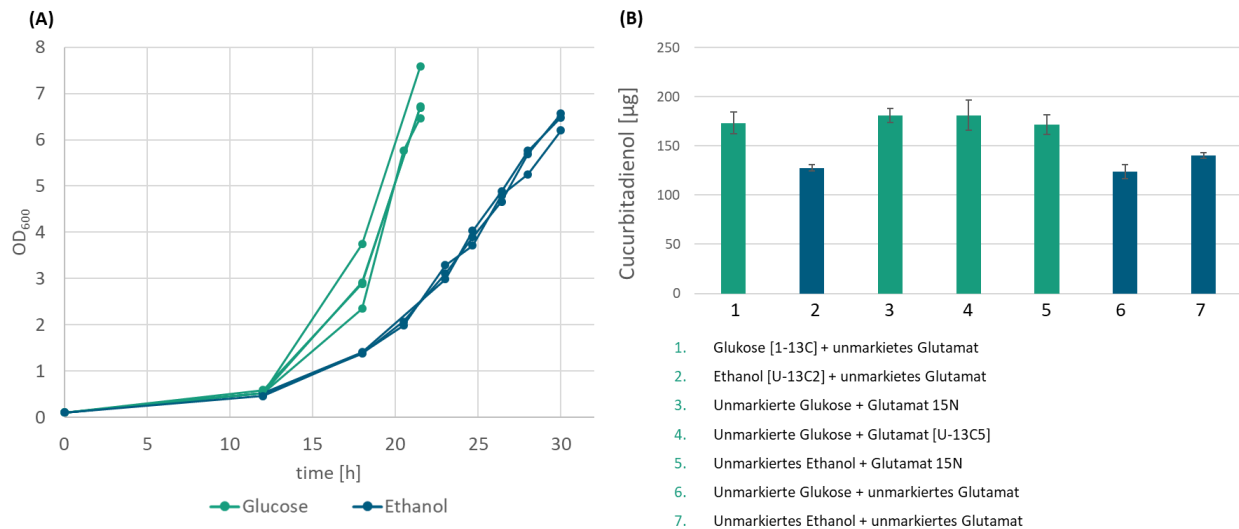


Abbildung 7: Anzucht des tetrazyklischen Triterpenoids produzierenden Hefestammes mit Isotop Markierung (n=3). (A) Wachstumskurven der sieben Ansätze aufgeteilt nach Kohlenstoffquelle. Die Kulturen wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 6 geerntet. (B) Vergleich der produzierten Triterpenoid Menge gemessen mittels GC-MS.

Alle messbaren Ergebnisse des IME zum Arbeitspaket 4 (s. Tabelle 2) wurden erfüllt.

- D5: Klonen von 10 Oxidosqualencyclasen und 5 Enzymen der Triterpenoxidation und 5 Enzymen für die Glykosylierung
- D6: Strategie der Hefeoptimierung basierend auf Stoffwechselprofilen
- D9: Optimierter Hefestamm für die Triterpenoid-Oxidation
- D12: Hefestamm mit hoher Produktionsleistung (>100 µg/L)

Zhang, W., Bell, E.W., Yin, M. et al. EDock: blind protein-ligand docking by replica-exchange monte carlo simulation. J Cheminform 12, 37 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00440-9>

AP4: Koordination und Öffentlichkeitsarbeit

Zum Projektstart wurde von den Verbundpartnern eine gemeinschaftliche Pressemitteilung (<https://www.ime.fraunhofer.de/de/presse/ASPIRANT.html>; s. Anhang) veröffentlicht. Zudem wurde das ASPIRANT Projekt auf dem vierten „International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research – SPhERe“ am 15.06.2021 von Boje Müller (Fraunhofer IME) in einer Invited Lecture vorgestellt. Im Berichtszeitraum wurden aufgrund der Corona-Pandemie zwei virtuelle Meetings am 24.04.2020 (kick-off und Koordination) und am 27.11.2020 (Vorstellung der bisherigen Ergebnisse) abgehalten. Zudem fand ein monatliches virtuelles Meeting mit allen Partnern statt, um den aktuellen Projektfortschritt zu monitorieren. Am 30.09.2021 trafen sich alle Kooperationspartner zur Besprechung bisheriger Ergebnisse und Planung des weiteren Vorgehens bei Phytowelt in Köln. Am 10. August 2022 fand das Projekttreffen *in persona* an der Technischen Universität München in Garching statt. Dabei wurde unter anderem ein Manuskript zur Beschreibung der wichtigsten Projektergebnisse geplant. Das Abschlusstreffen mit Industrieworkshop in Münster am 25.01.2023 wurde genutzt um die bisherigen Ergebnisse zusammenzufassen und die notwendigen Vorbereitungen für das Folgeprojekt Perspective zu planen.

Alle Meilensteine und messbaren Ergebnisse des IME zum Arbeitspaket 4 wurden erfüllt.

M5: Workshop mit potenziellen Industriepartnern zur Einführung maßgeschneiderter Triterpenoide

D13: Alle Berichte gemäß dem Projektplan geliefert.

II_3. Notwendigkeit/Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Aufgrund des hohen Neuheitsgrades der verwendeten Techniken und Anwendungen beinhaltet »ASPIRANT« sowohl wissenschaftliche als auch wirtschaftliche Risiken, so dass eine Durchführung nur mittels öffentlicher Förderung realisiert werden kann. Zurzeit gibt es weder weitere nationale noch europäische Förderaktivitäten, durch die diese Forschung gefördert werden könnte.

Das im Antrag skizzierte Verbundsystem besitzt alle technischen und personellen Voraussetzungen, um eine schnelle und gut-strukturierte Bearbeitung der entsprechenden Teilprojekte in »ASPIRANT« zu gewährleisten. Des Weiteren garantiert die Projektbearbeitung und Koordination durch das Fraunhofer IME eine schnellstmögliche Umsetzung der wissenschaftlichen Ergebnisse in die wirtschaftliche Verwertung. Es sind keine weiteren Forschungsanträge mit vergleichbarem Inhalt bei anderen öffentlichen Förderern gestellt.

II_4. Verwertbarkeit der Ergebnisse (Verwertungsplan)

Die Fraunhofer IME hat durch das Projekt »ASPIRANT« wesentliche neue Erkenntnisse und Ergebnisse zu pflanzlichen Triterpen-synthetisierenden und -modifizierenden Enzymen und zur metabolischen Analyse und Steuerung der Herstellung von Triterpenoiden in Hefen gewonnen, so dass eine zukünftige kommerzielle Verwertung realistisch erscheint. Darauf aufbauend wurde bereits das Projekt »PERSPECTIVE« (FKZ 031B1335A) vom BMBF bewilligt. Wissenschaftlich werden die Erkenntnisse in die Ausbildung von wissenschaftlichem und technischem Personal integriert und auf Tagungen präsentiert werden.

II_5. Im Projektzeitraum bekannt gewordene Fortschritte Dritter

Während des Projektzeitraums wurden vielseitige Fortschritte bei der Expression von Triterpenoid-produzierenden oder -modifizierenden Hefen gemacht.

Verschiedene Publikationen beschreiben Verbesserungen durch die Expansion des ERs (Jiang et al. 2021) oder durch die Nutzung subzellulärer Kompartimente (Shi et al. 2021, Dusséaux et al. 2021) zur Triterpenoid-Produktion. Zudem wurde Fortschritte in der Syntheseweg-Optimierung gemacht (Madhavan et al. 2021). Die Gene in den meisten Prozessen scheinen aktuell von Galaktose-induzierbaren Promotoren gesteuert zu werden, wobei eine Deregulation und Substrat-abhängige Anpassung der Promotoren im Fokus vieler Studien stehen (Carsanba et al. 2021, Kotopka et al. 2020, Deng et al. 2021, Bowman et al. 2020). Diese Entwicklungen greift das Nachfolge-Projekt »PERSPECTIVE« auf, um die bereits guten Produktionsraten weiter zu optimieren.

Jiang L, Huang L, Cai J, Xu Z, Lian J (2021) *Biotechnology and Bioengineering*, 118 (3), 1050–1065.

Shi Y, Wang D, Li R, Huang L, Zhuo D, Zhang X (2021). Engineering yeast subcellular compartments for increased production of the lipophilic natural products ginsenosides. *Metabolic Engineering*. 67. 10.1016/j.ymben.2021.06.002.

Dusséaux S, Wajn WT, Liu Y, Ignea C, Kampranis SC (2021) Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids. *PNAS* 117(50):31789-31799. doi: 10.1073/pnas.2013968117.

Madhavan A, Arun KB, Sindhu R. et al. (2021) Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact* 20, 124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>

Carsanba E, Pintado M, Oliveira C. (2021) Fermentation Strategies for Production of Pharmaceutical Terpenoids in Engineered Yeast. *Pharmaceuticals* 14(4):295. <https://doi.org/10.3390/ph14040295>

Kotopka BJ, Smolke CD (2020) Model-driven generation of artificial yeast promoters. *Nat Commun* 11, 2113. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15977-4>

Deng J, Wu Y, Zheng Z. et al. (2021) A synthetic promoter system for well-controlled protein expression with different carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 20, <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01691-3>

Bowman E, Deaner M, Cheng J-F, Evans R, Oberortner E, Yoshikuni Y, Alper H (2020). Bidirectional titration of yeast gene expression using a pooled CRISPR guide RNA approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117. 202007413. [10.1073/pnas.2007413117](https://doi.org/10.1073/pnas.2007413117).

II_6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Bröker J N, Müller B, Prüfer D, Schulze Gronover C (2020), Combinatorial Metabolic Engineering in *Saccharomyces cerevisiae* for the Enhanced Production of the FPP-Derived Sesquiterpene Germacrene, *Bioengineering* 2020, DOI: [10.3390/bioengineering7040135](https://doi.org/10.3390/bioengineering7040135)

Geplante Veröffentlichungen:

Cox et al. (2023) Production of an anti-inflammatory plant triterpenoid by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Cox et al. (2023) Genes involved in escin biosynthesis in *Aesculus hippocastanum*

Cox et al. (2023) Hedarin biosynthesis in *Hedera helix*