



# **Neue Technologien zur Modifikation des Genoms – Anwendungen in der industriellen Biotechnologie**

„Genome Editing“ in Mikroorganismen

Dr. Gerd Seibold

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm



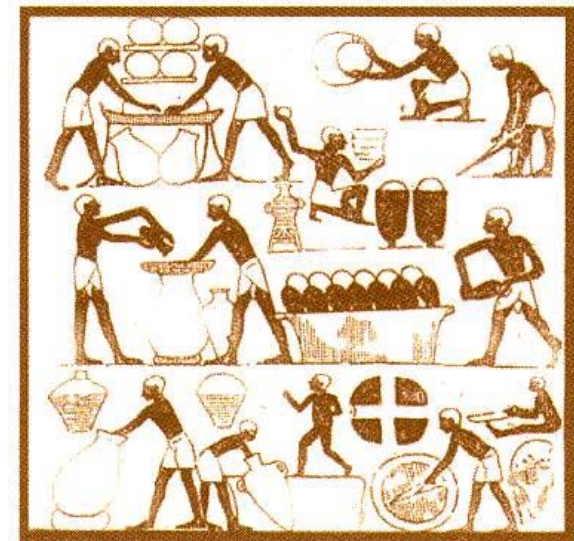
„Biotechnology is the exploitation of biological processes for industrial or other purposes.“

(J. Rushton & C. Evans in Basic Biotechnology, 3<sup>rd</sup> edition, 2006)

## Herstellung von Ethanol mit *Saccharomyces cerevisiae*



- 6000 bis 8000 Jahre altes Handwerk aus Mesopotamien (Irak)
- Gerste bzw. Emmer zum Keimen gebracht
- Malz (gekeimte Getreidekörner) zu Bierbrot verbucken
- zerbröckeltes Brot wurden mit Wasser versetzt
- nach Abtrennung der Flüssigkeit wurde diese unter Luftabschluss vergoren
- Babylonier: parallele Hefe- und Milchsäuregärung → **Haltbarkeit!**
- Ägypter: Verwendung von Inokulum durch Benutzung alter Fässer  
→ **erstes Flaschenbier** beim Pyramidenbau!



## Herstellung von Ethanol mit *Saccharomyces cerevisiae*



ulm university universität  
**uulm**

### CropEnergies AG

Gründungsdatum :2006

Hauptsitz: **Mannheim**

Produktionsstätten **Zeitz, Deutschland; Wanze, Belgien; Wilton, Großbritannien;**

**Loon-Plage, Frankreich**

Mitarbeiter: **416**

Produktionskapazität (pro Jahr):

**1,3 Millionen m<sup>3</sup> Bioethanol** für Kraftstoffanwendungen

rd. **150.000 m<sup>3</sup> Bioethanol** für technische und traditionelle Anwendungen

**Lebens- und Futtermittel: Gluten, Verflüssigtes CO<sup>2</sup>, ProtiGrain<sup>®</sup> / DDGS, ProtiWanze<sup>®</sup> (CDS)**

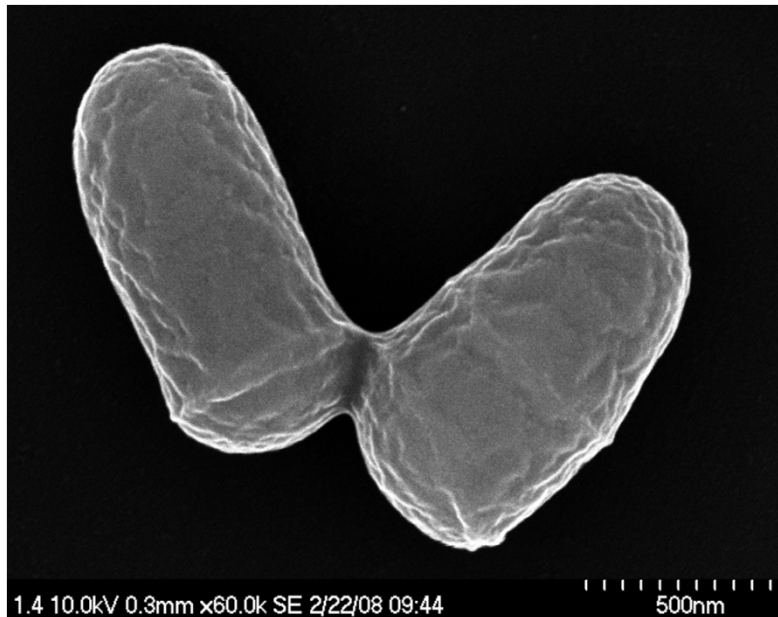


**Es entsteht dabei kein Abfall!!!**

(Quelle [http://www.cropenergies.com/de/Unternehmen/Ueber\\_Uns/](http://www.cropenergies.com/de/Unternehmen/Ueber_Uns/))

Bioethanolanlage der CropEnergies AG (vormals *Südzucker Bioethanol GmbH*) in Zeitz (Sachsen-Anhalt) ist die größte Europas (360.000 m<sup>3</sup> Bioethanol).

## Das Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*



- Isoliert von Kinoshita et al., 1957
- Gram-positiv, Unbeweglich, unregelmäßige Stäbchen
- Nicht pathogen
- Industrielle Aminosäureproduktion (Glutamate: 1.5 Mio t/a; Lysine: 1.2 Mio t/a)

# Beispiele für Anwendungen von Aminosäuren



## Aminosäure

L-Asparagin

L-Cystein

L-Glutamat

L-Lysin

D,L-Methionin

L-Phenylalanin

L-Prolin

L-Tryptophan

## Nutzung

Süßstoff

Lebensmittelzusatz

Geschmacksverstärker

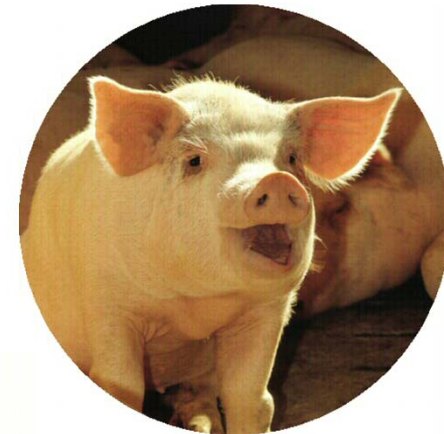
**Futtermittelzusatz,**  
diätische Lebensmittel

**Futtermittelzusatz**

Pharmaka, Süßstoff

Infusionen

Pharmaka, Infusionen



## Warum Aminosäuren als Futterzusatz?



- Aminosäurezufütterung erhöht den Proteinnährwert des Futters
- bei Methionin und Lysin etwa um den Faktor 2

## Aminosäuren als Futterzusatz

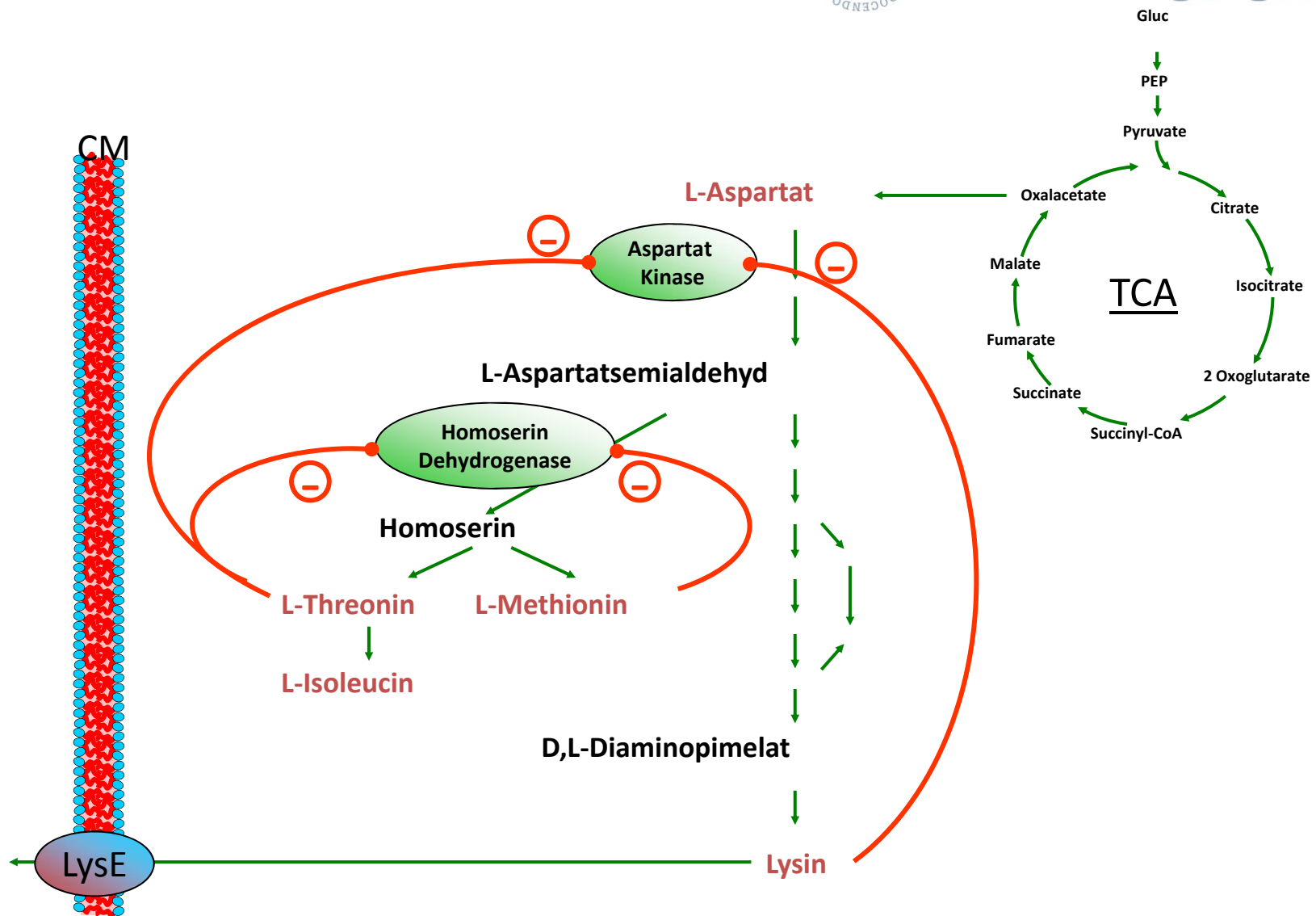


- auch ohne weitere Reinigung möglich  
(→ Sprühtrocknung des gesamten Fermenter-Inhalts)
- kein „Müll“, kein Abwasser
- Vorteil bei der Verwendung von *C. glutamicum* :
  - *C. glutamicum* besitzt GRAS-Status
  - keine immunogene Wirkung da keine Lipopolysaccharide
  - in *E. coli* durch LPS aufwendige Produktabtrennung notwendig

**BASF-Werk in Gusan/Südkorea, jährliche  
Lysinproduktion 100.00 Tonnen**

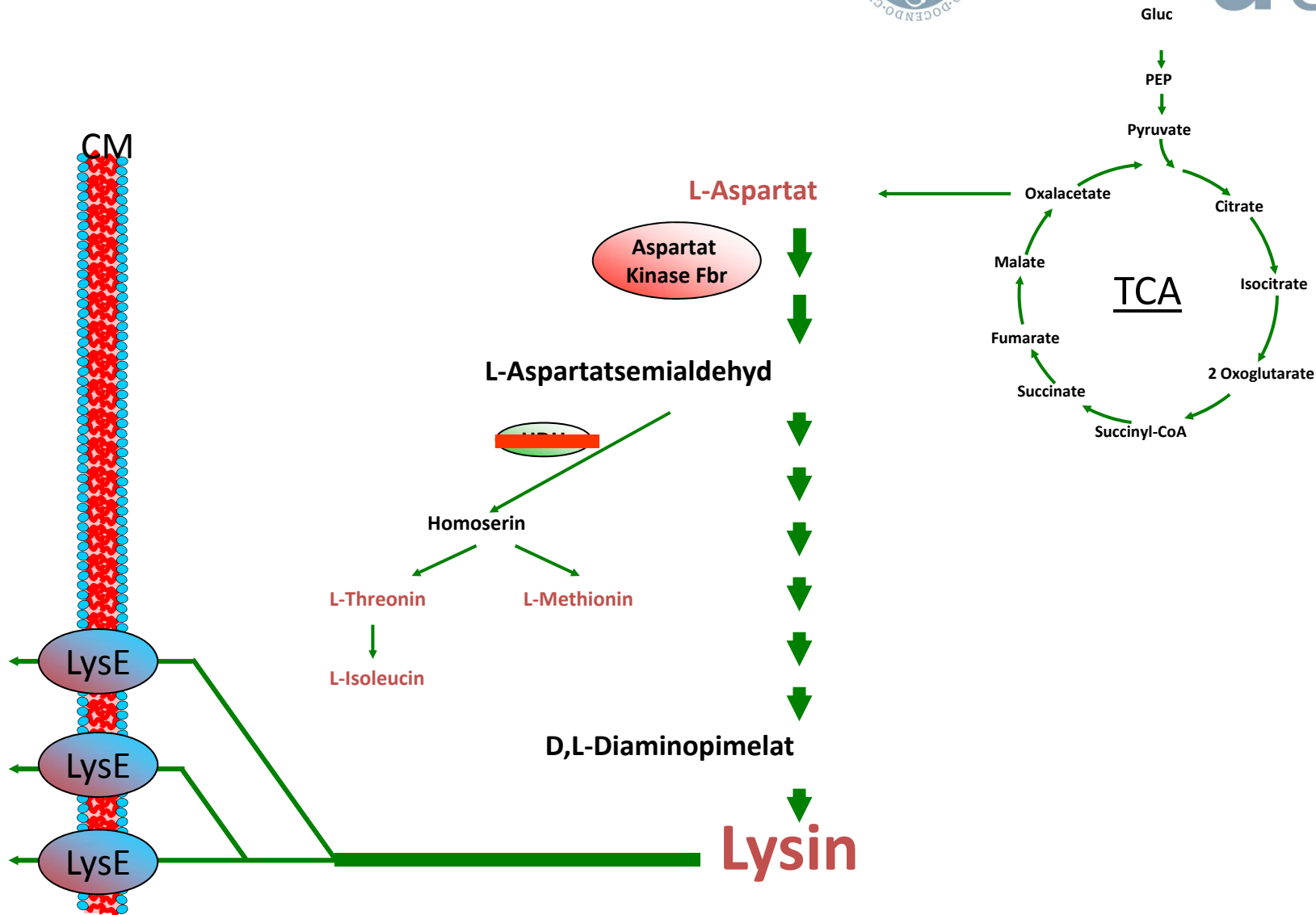


# L-Lysin Metabolismus in *C. glutamicum*



„Feed back“-Inhibition wie bei der Synthese vieler Aminosäuren

# Optimierter L-Lysin Metabolismus



**Optimierung ergab bis zu 132 g / l (0,9 M) Lysin im Nährmedium!**

## Strategien zur Erzeugung von Produktionsstämmen



- Vermeidung von Abflüssen in andere Stoffwechselwege oder Abbau
- Mutagenese und Screening nach feedback-resistenten Schlüsselenzymen

# Strategien zur Erzeugung von Produktionsstämmen



Appl Microbiol Biotechnol (2002) 58:217–223  
DOI 10.1007/s00253-001-0883-6

ORIGINAL PAPER

J. Ohnishi · S. Mitsuhashi · M. Hayashi · S. Ando  
H. Yokoi · K. Ochiai · M. Ikeda

## **A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant**

Received: 2 September 2001 / Revision received: 15 October 2001 / Accepted: 19 October 2001 / Published online: 8 December 2001  
© Springer-Verlag 2001

Erzeugung eines Lysinproduktions-Stammes aus *C. glutamicum* ATCC13032 durch Einbringen bekannter Mutationen aus durch Mutagenese und Selektion erhaltener Produktionsstämme – mittels Deletionen und gezieltem Austausch von DNA Sequenzen (Allelic Replacement) – „Nachbau der Lysinproduktions-Stämme“

## Herstellung einer Deletionsmutante in *C. glutamicum*

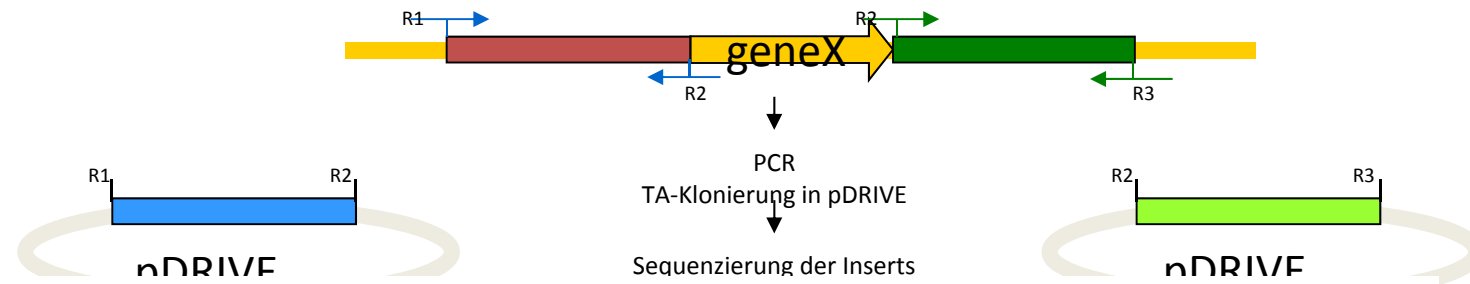
Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73.

**Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum.**

Schäfer A<sup>1</sup>, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.

Mit dem in der Arbeit beschriebenen Systemen sind Deletion und „Allelic Replacement“ in *C. glutamicum* möglich! -> die erhaltenen Stämme sind (wenn gewollt) „Marker-frei“.

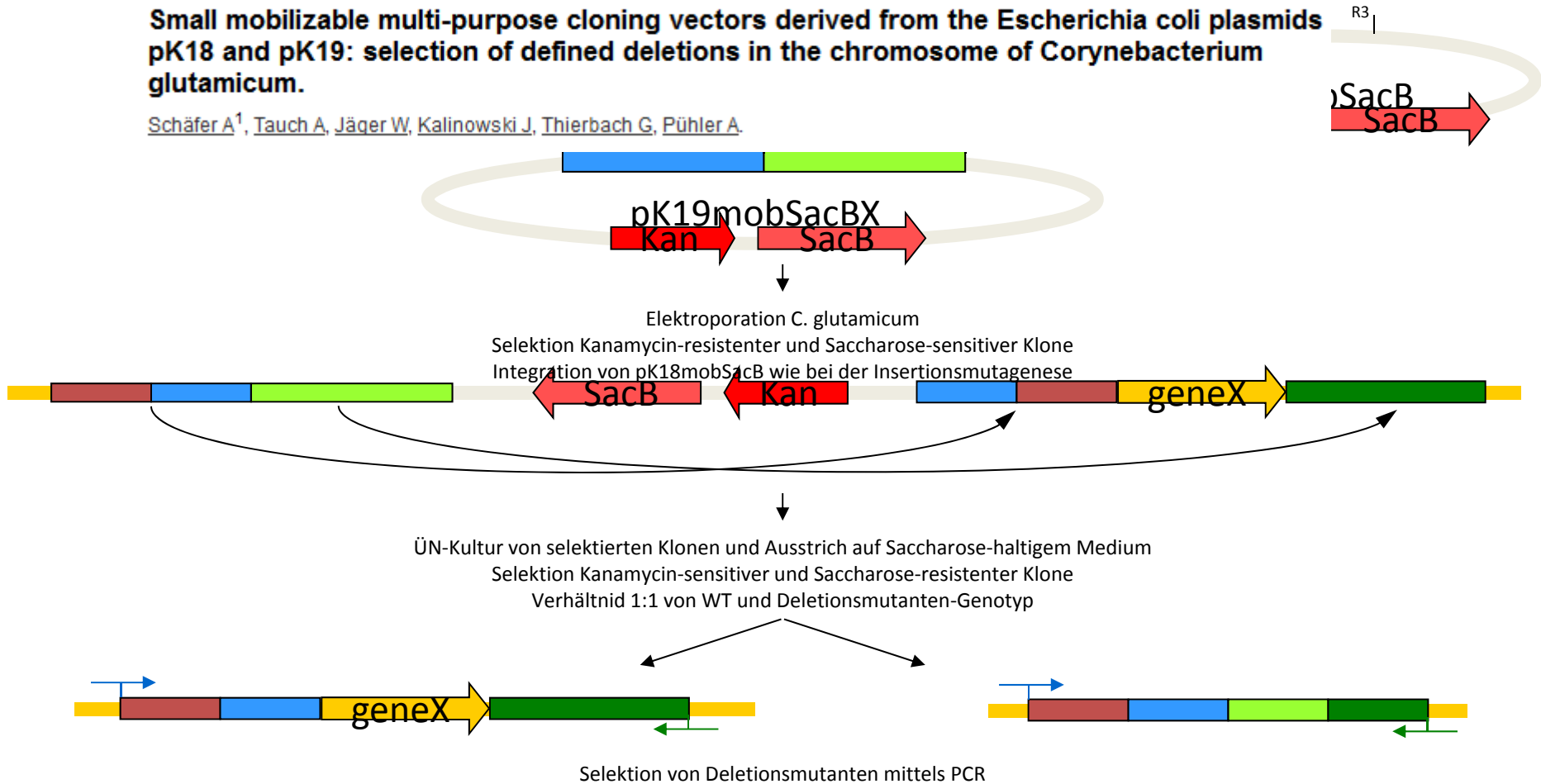
# Herstellung einer Deletionsmutante in *C. glutamicum*



[Gene, 1994 Jul 22;145\(1\):69-73.](#)

**Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*.**

[Schäfer A<sup>1</sup>, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.](#)



## Strategien zur Erzeugung von Produktionsstämmen



- Vermeidung von Abflüssen in andere Stoffwechselwege oder Abbau
- Mutagenese und Screening nach feedback-resistenten Schlüsselenzymen
- gezielte gentechnische Manipulation durch homologe Rekombination
  - Deletion von Genen
  - Überexpression von Genen
  - Modifikation von Promotoren
  - Modifikation von Proteinsequenzen
- gezielte Suche nach Angriffspunkten
  - Transkriptom, Proteom, Metabolom
  - Fluxanalysen

## Genetisch veränderte Organismen (GVO)



Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) sind Organismen, bei denen das genetische Material mit Hilfe molekularbiologischer Methoden in einer Weise verändert worden ist, wie es natürlicherweise durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht möglich ist (GenTG, Richtlinie 2001/18/EG). Die Gentechnik verfügt über verschiedene Methoden, um fremde DNA in einen Organismus einzuführen und so einen GVO mit neuen Eigenschaften, auch transgener Organismus genannt, herzustellen.





Research Article

## Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum* – a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters

---

*Simon Unthan*<sup>1</sup>, *Meike Baumgart*<sup>2</sup>, *Andreas Radek*<sup>1</sup>, *Marius Herbst*<sup>3</sup>, *Daniel Siebert*<sup>3</sup>, *Natalie Brühl*<sup>4</sup>,  
*Anna Bartsch*<sup>4</sup>, *Michael Bott*<sup>2</sup>, *Wolfgang Wiechert*<sup>1</sup>, *Kay Marin*<sup>5</sup>, *Stephan Hans*<sup>5</sup>, *Reinhard Krämer*<sup>4</sup>,  
*Gerd Seibold*<sup>4</sup>, *Julia Frunzke*<sup>2</sup>, *Jörn Kalinowski*<sup>6</sup>, *Christian Rückert*<sup>6</sup>, *Volker F. Wendisch*<sup>3</sup> and *Stephan Noack*<sup>1</sup>

Verkleinerung des *C. glutamicum* Genoms um 20% durch konsekutive Deletion von etwa 20 Abschnitten mit nicht-essentiellen Genen (z.B. für Prophagen, IS-Elemente) – maßgeschneidertes Genom + erhöhte Stabilität

# Anwendung von CRISPR-CAS

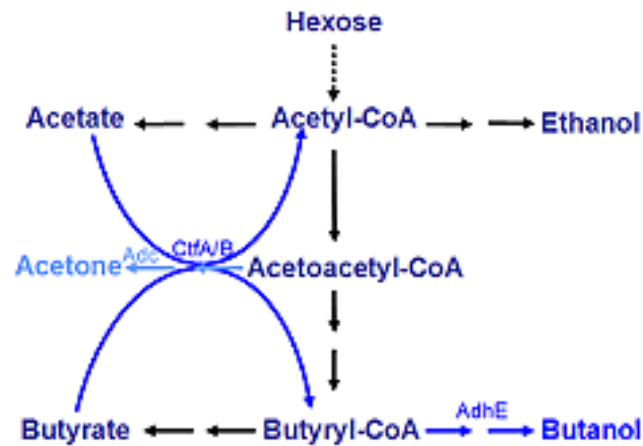
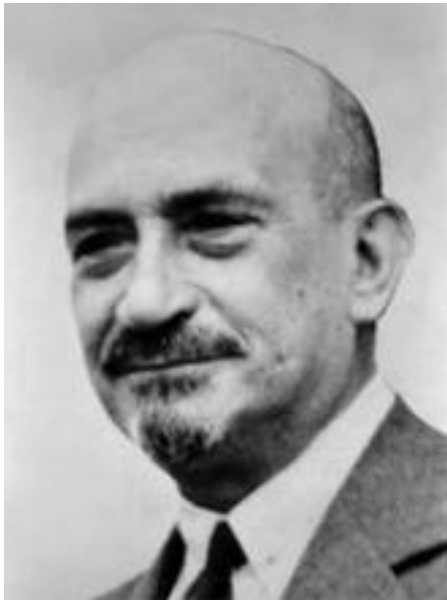


Sander & Young 2014 Nature Biotechnology 32(4): 347-355

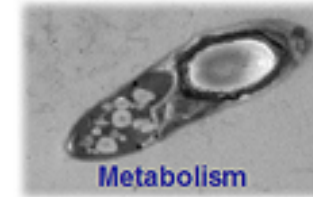
Überblick über die verschiedenen Anwendungen von CRISPR-Cas:  
z.B. Deletion, Insertion, CROSPRi (interference – unterdrückung der  
Transkription von Zielgenen), Aktivierung, und Detektion von  
intrazellulären Nukleinsäuren



# Chaim Weizmann: Aceton + Butanol mit *Clostridium acetobutylicum*



## The Metabolic Switch



Clostridien können zur Produktion von Lösungsmitteln verwendet werden, manche Stämme sind autotroph (können mit CO plus CO<sub>2</sub> plus H<sub>2</sub> wachsen) und erlauben daher die Nutzung von Abgasen aus z.B. der Stahlerzeugung (Verminderung von CO und CO<sub>2</sub>)

# „Genome Editing“ in Clostridien mit CRISPR-Cas



## **Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*,**

Michael E. Pyne, Mark R. Bruder, Murray Moo-Young, Duane A. Chung, C. Perry Chou, *Scientific Reports*, 6: 25666, DOI: 10.1038/srep25666

Mit dem vorgestellten Systemen sind markerfreie Deletionen in Clostridien möglich, damit gezielte Optimierung von Stämmen

**„Genome Editing“  
in *S. cerevisiae*  
mit CRISPR-Cas aus  
*Streptococcus*  
*pyogenes***



**Towards the exploitation of glycerol's high reducing power in *Saccharomyces cerevisiae*-based bioprocesses,**  
Mathias Klein, Martina Carrillo, Joeline Xiberras, Zia-ul Islam, Steve Swinnen, Elke Nevoigt, Metabolic Engineering, Volume 38, 2016, 464–472,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.008>

Auch in Bäckerhefe lässt sich jetzt sehr einfach und schnell das Genom modifizieren (z.B. neue Gene ins Genom einbringen)



2 JULY 2010 VOL 329 SCIENCE www.sciencemag.org

## Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson,<sup>1</sup> John I. Glass,<sup>1</sup> Carole Lartigue,<sup>1</sup> Vladimir N. Noskov,<sup>1</sup> Ray-Yuan Chuang,<sup>1</sup> Mikkel A. Algire,<sup>1</sup> Gwynedd A. Benders,<sup>2</sup> Michael G. Montague,<sup>1</sup> Li Ma,<sup>1</sup> Monzia M. Moodie,<sup>1</sup> Chuck Merryman,<sup>1</sup> Sanjay Vashee,<sup>1</sup> Radha Krishnakumar,<sup>1</sup> Nacyra Assad-Garcia,<sup>1</sup> Cynthia Andrews-Pfannkoch,<sup>1</sup> Evgeniya A. Denisova,<sup>1</sup> Lei Young,<sup>1</sup> Zhi-Qing Qi,<sup>1</sup> Thomas H. Segall-Shapiro,<sup>1</sup> Christopher H. Calvey,<sup>1</sup> Prashanth P. Parmar,<sup>1</sup> Clyde A. Hutchison III,<sup>2</sup> Hamilton O. Smith,<sup>2</sup> J. Craig Venter<sup>1,2\*</sup>

- Synthese und Assemblierung eines bakteriellen Genoms (*Mycoplasma mycoides* als Vorlage: *M. mycoides* JCVIsyn1.0 [1,078,809 base pairs (bp)])
- Transfer in leere Hülle von *Mycoplasma capricolum*

# Genomsynthese zur Erzeugung von Stämmen



## RESEARCH ARTICLE

### SYNTHETIC BIOLOGY

# Design and synthesis of a minimal bacterial genome

Clyde A. Hutchison III,<sup>1\*</sup>† Ray-Yuan Chuang,<sup>1</sup>‡ Vladimir N. Noskov,<sup>1</sup>  
Nacyra Assad-Garcia,<sup>1</sup> Thomas J. Deerinck,<sup>2</sup> Mark H. Ellisman,<sup>2</sup> John Gill,<sup>3</sup>  
Krishna Kannan,<sup>3</sup> Bogumil J. Karas,<sup>1</sup> Li Ma,<sup>1</sup> James F. Pelletier,<sup>4</sup>§ Zhi-Qing Qi,<sup>3</sup>  
R. Alexander Richter,<sup>1</sup> Elizabeth A. Strychalski,<sup>4</sup> Lijie Sun,<sup>1</sup>|| Yo Suzuki,<sup>1</sup>  
Billyana Tsvetanova,<sup>3</sup> Kim S. Wise,<sup>1</sup> Hamilton O. Smith,<sup>1,3</sup> John I. Glass,<sup>1</sup>  
Chuck Merryman,<sup>1</sup> Daniel G. Gibson,<sup>1,3</sup> J. Craig Venter<sup>1,3\*</sup>

- Optimierung des künstlichen Genoms
- Ausgangspunkt: *M. mycoides* JCVIsyn1.0 [1,078,809 base pairs (bp))
- Drei Zyklen Design, Synthese, Test: *M. mycoides* JCVIsyn3.0 (531 Kilobase pairs, 473 Gene)
- - 149 essentielle Gene mit unbekannter Funktion





www.sciencemag.org SCIENCE VOL 344 4 APRIL 2014

## Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome

Narayana Annaluru,<sup>1\*</sup> Héloïse Muller,<sup>1,2,3,4\*</sup> Leslie A. Mitchell,<sup>2,5</sup> Sivaprakash Ramalingam,<sup>1</sup> Giovanni Stracquadanio,<sup>2,6</sup> Sarah M. Richardson,<sup>6</sup> Jessica S. Dymond,<sup>2,7</sup> Zheng Kuang,<sup>2</sup> Lisa Z. Scheifele,<sup>2,8</sup> Eric M. Cooper,<sup>2</sup> Yizhi Cai,<sup>2,9</sup> Karen Zeller,<sup>2</sup> Neta Agmon,<sup>2,5</sup> Jeffrey S. Han,<sup>10</sup> Michalis Hadjithomas,<sup>11</sup> Jennifer Tullman,<sup>6</sup> Katrina Caravelli,<sup>2,12</sup> Kimberly Cirelli,<sup>1,12</sup> Zheyuan Guo,<sup>1,13</sup> Viktoriya London,<sup>1,13</sup> Apurva Yeluru,<sup>1,13</sup> Sindurathy Murugan,<sup>6</sup> Karthikeyan Kandavelou,<sup>1,14</sup> Nicolas Agier,<sup>15,16</sup> Gilles Fischer,<sup>15,16</sup> Kun Yang,<sup>2,6</sup> J. Andrew Martin,<sup>2,6</sup> Murat Bilgel,<sup>13</sup> Pavlo Bohutskyi,<sup>13</sup> Kristin M. Boulter,<sup>12</sup> Brian J. Capaldo,<sup>13</sup> Joy Chang,<sup>13</sup> Kristie Charoen,<sup>13</sup> Woo Jin Choi,<sup>13</sup> Peter Deng,<sup>11</sup> James E. DiCarlo,<sup>13</sup> Judy Doong,<sup>13</sup> Jessilyn Dunn,<sup>13</sup> Jason I. Feinberg,<sup>12</sup> Christopher Fernandez,<sup>12</sup> Charlotte E. Floria,<sup>12</sup> David Gladowski,<sup>12</sup> Pasha Hadidi,<sup>13</sup> Isabel Ishizuka,<sup>12</sup> Javaneh Jabbari,<sup>12</sup> Calvin Y. L. Lau,<sup>13</sup> Pablo A. Lee,<sup>13</sup> Sean Li,<sup>13</sup> Denise Lin,<sup>12</sup> Matthias E. Linder,<sup>12</sup> Jonathan Ling,<sup>13</sup> Jaime Liu,<sup>13</sup> Jonathan Liu,<sup>13</sup> Mariya London,<sup>12</sup> Henry Ma,<sup>13</sup> Jessica Mao,<sup>13</sup> Jessica E. McDade,<sup>13</sup> Alexandra McMillan,<sup>12</sup> Aaron M. Moore,<sup>12</sup> Won Chan Oh,<sup>13</sup> Yu Ouyang,<sup>13</sup> Ruchi Patel,<sup>13</sup> Marina Paul,<sup>12</sup> Laura C. Paulsen,<sup>13</sup> Judy Qiu,<sup>13</sup> Alex Rhee,<sup>13</sup> Matthew G. Rubashkin,<sup>13</sup> Ina Y. Soh,<sup>12</sup> Nathaniel E. Sotuyo,<sup>12</sup> Venkatesh Srinivas,<sup>13</sup> Allison Suarez,<sup>13</sup> Andy Wong,<sup>13</sup> Remus Wong,<sup>13</sup> Wei Rose Xie,<sup>12</sup> Yijie Xu,<sup>13</sup> Allen T. Yu,<sup>12</sup> Romain Koszul,<sup>3,4</sup> Joel S. Bader,<sup>2,6</sup> Jef D. Boeke,<sup>2,11,5†</sup> Srinivasan Chandrasegaran<sup>1†</sup>

Austausch des 316617 Bp großen Chromosoms III von *Saccharomyces cerevisiae* durch 272871 Bp “designer eukaryotic chromosome” synIII  
Dabei folgende Veränderungen:  
TAG/TAA stop-codon replacements  
Deletion der subtelomeren Regionen, Introns, transfer RNAs, Transposons, und “silent mating loci”.

### [Synthetic Yeast 2.0](http://syntheticyeast.org/)

Building the world's first synthetic eukaryotic genome together

<http://syntheticyeast.org/>

## Zusammenfassung



- Keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen in der industriellen Biotechnologie (bei kostengünstigen Produkten) -> Resteverwertung Futtermittel
- aber Nutzung von Gentechnik zur Modifikation des Genoms von Mikroorganismen für die industrielle Biotechnologie zulässig
- Neue Technologien ermöglichen Gentechnik bei bislang nur schwer manipulierbaren Organismen
- Maßgeschneiderte Genome durch Synthese und Austausch möglich

# Acknowledgements



**Prof. Dr. Bernhard Eikmanns**

**Prof. Dr. Reinhard Krämer**

**Prof. Dr. Peter Dürre**

**Teams in den Laboren in Köln &  
Ulm**

## **Financial support:**



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

