

Unkonventionelle Sekretion von Nanobodies für die Virusdetektion

Magnus Philipp, Joana Charlot Pohlentz, Simon Wegmann & Kerstin Schipper

Article - Version of Record



Suggested Citation:

Philipp, M., Pohlentz, J. C., Wegmann, S., & Schipper, K. (2023). Unkonventionelle Sekretion von Nanobodies für die Virusdetektion. *Biospektrum*, 29(7), 800–802.
<https://doi.org/10.1007/s12268-023-2043-3>

Wissen, wo das Wissen ist.



UNIVERSITÄTS- UND
LANDESBIBLIOTHEK
DÜSSELDORF

This version is available at:

URN: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:061-20250228-100038-8>

Terms of Use:

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

For more information see: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Antikörper-Formate

Unkonventionelle Sekretion von Nanobodies für die Virusdetektion

MAGNUS PHILIPP, JOANA CHARLOT POHLENTZ, SIMON WEGMANN,
KERSTIN SCHIPPER
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

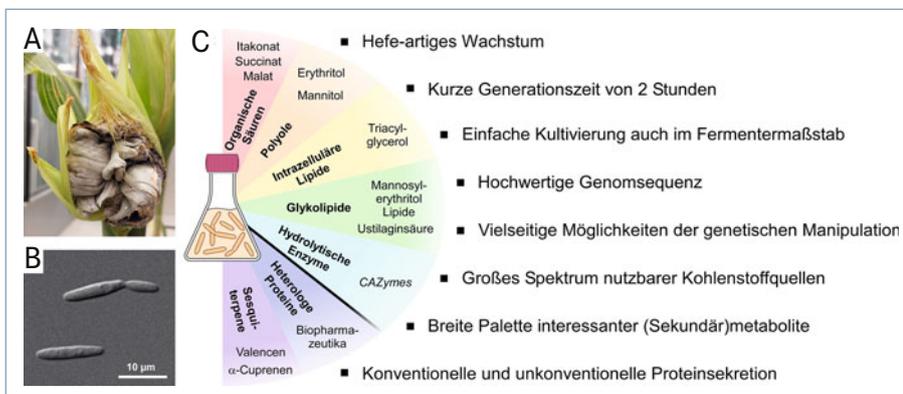
The fungus *Ustilago maydis* is a natural producer of diverse compounds with biotechnological relevance. Synthetic biology approaches have further expanded the portfolio by heterologous molecules like pharmaceutical proteins. Recently, we engineered *U. maydis* for the production of nanobodies directed against the SARS-CoV-2 spike protein. Applying a chitin-binding carrier, we established nanobody immobilization, paving the way for inexpensive antigen tests based on a ubiquitous biogenic material.

DOI: 10.1007/s12268-023-2043-3
© Die Autorinnen und Autoren 2023

Der Pilz *Ustilago maydis* ist vorwiegend bekannt als Erreger des Maisbeulenbrands (**Abb. 1**) und lange drehte sich die Forschung um Grundlagenaspekte, wie Signaltransduktion, Zellbiologie oder die molekularen Mechanismen der Infektion. Schon in den frühen 1960er-Jahren wurde jedoch beobachtet, dass die Pilzkulturen interessante Substanzen produzieren. So werden unter Stickstoffmangelbedingungen beispielsweise organische Säuren, wie Itakononat, oder die Glykolipide Ustilaginsäure und Mannosylethritol-Lipide synthetisiert, die als Plattformchemikalie bzw. als Biotenside genutzt

werden können [1]. Kürzlich wurde zudem entdeckt, dass die Pilzzellen unter bestimmten Bedingungen auch mikrobielles Öl (*single cell oil*) akkumulieren können (**Abb. 1**). In den vergangenen Jahren interessierten sich Forscher auf der ganzen Welt daher zunehmend für die Produkte von *U. maydis* und verwandten Basidiomyceten, die nah mit den Hutpilzen verwandt sind. Während *U. maydis* als dimorpher Pilz für die Pflanzeninfektion zum Hyphenwachstum wechselt, kann er in Kultur als Hefe gehalten werden. Interessanterweise gelten die durch *U. maydis*-Infektionen herbeigeführten

Tumore in den Maiskolben in Mexiko und Zentralamerika als Delikatesse. Im Hefestadium sind die Zellen apathogen und lassen sich sehr gut im Labor kultivieren und genetisch modifizieren. Auch die Anzucht in Bioreaktoren ist so problemlos möglich. Vergleichbar mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wächst *U. maydis* in der Hefeform unter optimalen Bedingungen mit einer Verdopplungszeit von etwa zwei Stunden. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen „Biotech-Pilzen“, wie den filamentösen Ascomyceten (*Aspergillus*, *Neurospora* etc.; **Abb. 1**). *U. maydis* ist als langjähriges Modell der Basidiomyceten genetisch hervorragend manipulierbar. Stabile Stämme können mittels CRISPR-Cas9 oder klassischer homologer Rekombination generiert werden und moderne molekulare Werkzeuge wie die Resistenzkassetten-Rückgewinnung oder die Nutzung polycistronischer mRNA mithilfe des 2A-Peptids sind gut etabliert. Dies ermöglichte die Entschlüsselung der den verschiedenen Produkten zugrunde liegenden Biosynthesewege und förderte neue Ansätze für die Entwicklung potenter Produktionsstämme. Weiterhin ist es durch genetisches Engineering auch möglich, Gene für (heterologe) Enzyme einzubringen. So können nun beispielsweise Sesquiterpene aus Hutpilzen oder Pflanzen hergestellt werden (**Abb. 1**, [1]).



▲ Abb. 1: *Ustilago maydis* als Produzent biotechnologisch-relevanter Moleküle. **A**, Der Pilz ist in der Natur der Erreger des Maisbeulenbrands. **B**, Im Labor wächst er als Hefe durch Knospung. **C**, In dieser Form ist *U. maydis* genetisch manipulierbar und kann als Produzent für verschiedene natürlich-vorkommende sowie für heterologe Produkte (z. B. Sesquiterpene, heterologe Proteine) eingesetzt werden.

Synthese heterologer Proteine

U. maydis kann neben der Metabolitensynthese auch für die Produktion von Proteinen genutzt werden [1]. Als Pflanzenpathogen besitzt *U. maydis* per se gute Fähigkeiten zur Sekretion von Proteinen, die u. a. für die Proliferation in der Pflanze und die Modulation der pflanzlichen Immunantwort benötigt werden. Interessant ist für uns aber vorwiegend ein spezieller, bislang nur in *U. maydis* beschriebener unkonventioneller Sekretionsweg (**Abb. 2**): Bei dieser Art des Proteinexports werden die Moleküle nicht wie in Eukaryoten üblich über das Endomembransystem sekretiert, sondern über alternative Wege. Im Fall von *U. maydis* haben wir beobachtet, dass die Chitinase Cts1 im Verlauf der Tei-

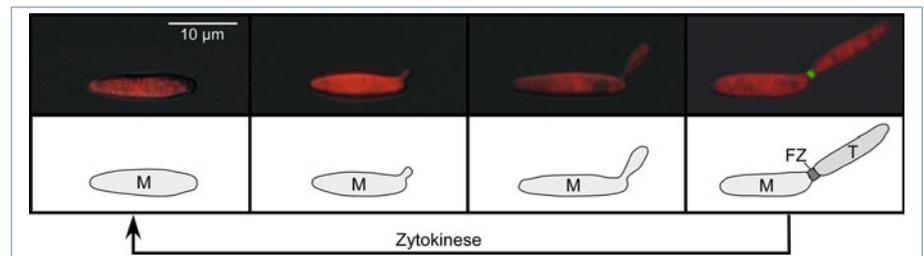
lung von Hefezellen in die Fragmentierungszone rekrutiert und von dort freigesetzt wird [2]. Cts1 kann als Exportshuttle für heterologe Proteine verwendet werden, die somit ebenfalls sekretiert werden. Gegenüber der klassischen Sekretion hat dies den Vorteil, dass die Proteine nicht posttranslational modifiziert werden, d. h. beispielsweise keine Zuckerketten über *N*-Glykosylierung angehängt werden. Auch konnte bislang keine Größenlimitierung für den Export festgestellt werden [3]. Unterschiedliche Proteine konnten so bereits in funktioneller Form produziert werden. Dazu zählen bakterielle Enzyme oder verschiedene pharmazeutisch-relevante Antikörper-Formate, wie beispielsweise *single chain variable fragments* (scFv) oder Antigen-Bindedomänen von Schwereketten-Antikörpern (Nanobodies).

Produktion von Sars-CoV-2-Nanobodies

In unserer neuesten Studie haben wir – inspiriert durch die Erfahrungen während der Covid-19-Pandemie – die Produktion von Nanobodies gegen die Rezeptor-Bindedomäne (RBD) des SARS-CoV-2-Spike-Proteins als Cts1-Fusionsprotein getestet. Nanobodies sind kleine alternative Antikörper-Formate, die sich von Schwere-Ketten-Antikörpern aus der Familie der Kameliden ableiten (**Abb. 3**). Aufgrund ihrer einmaligen Struktur und 10-fach geringerer Größe können Nanobodies bei gleicher Bindeeffizienz schneller generiert und kostengünstiger produziert werden als konventionelle monoklonale Antikörper. Sie zeichnen sich durch eine hohe Temperaturstabilität aus, sind gewebeängig und können sogar die Blut-Hirn-Schranke überwinden [4].

Für unsere Studie haben wir unterschiedliche, bereits beschriebene Nanobodies als Mono- oder (Hetero)-Dimere in *U. maydis* synthetisiert [5, 6] und die besten Produktionsstämme charakterisiert [7]. Die Nanobody-Cts1-Fusionsproteine waren in der Lage, die RB-Domäne spezifisch zu binden. Die Bindeaffinität war dabei im nanomolaren Bereich und vergleichbar mit den publizierten Werten. Neben der Interaktion mit der RB-Domäne haben unsere Kooperationspartner um Prof. Dr. Heiner Schaal (Institut für Virologie, Universität Düsseldorf) auch die Bindung und Neutralisierung des intakten SARS-CoV-2-Virus durch die Cts1-Nanobody-Fusionen zeigen können (**Abb. 3**).

Cts1 hydrolysiert als Chitinase kurze *N*-Acetylglukosamin-Oligomere, aber keine



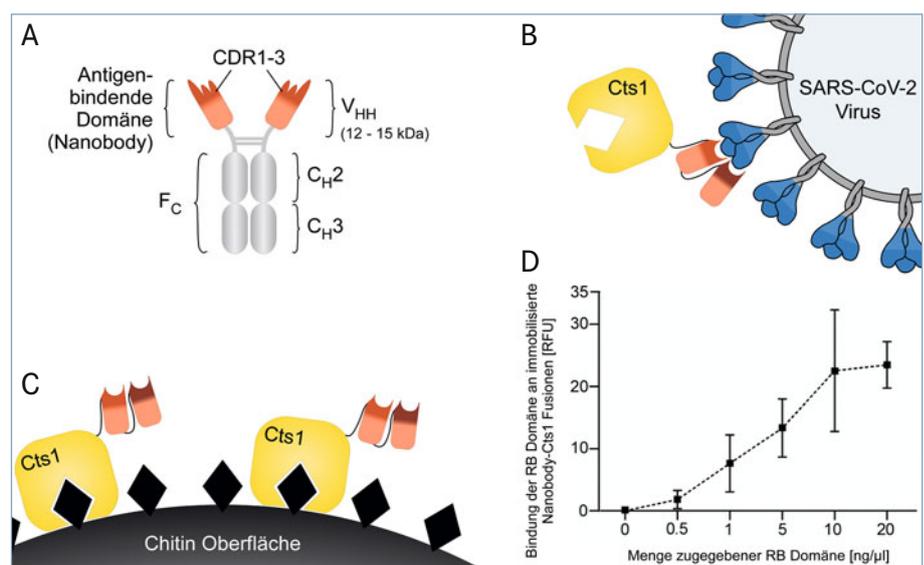
▲ **Abb. 2:** Zytokinese-abhängige unkonventionelle Sekretion in *Ustilago maydis*. Die Pilzzellen teilen sich durch Knospung. Zwei nacheinander gebildete Septen trennen Mutter (M)- und Tochterzelle (T) und bilden die Fragmentierungszone (FZ) aus. Die Chitinase Cts1 wird in die FZ rekrutiert und ausgeschleust. Mikroskopische Aufnahmen: grün: Cts1-Gfp; rot: zytoplasmatisches mCherry.

längeren Polymere [8]. Das Enzym zeigt außerdem eine starke Bindung an Chitin-Oberflächen, wie z. B. magnetische Chitin-Kügelchen, ohne diese Strukturen anzugreifen. Um diese Eigenschaften auszunutzen, haben wir zusätzlich zu einem herkömmlichen ELISA-basierten Nachweis der Antigen-Bindung weiterführende Tests mit Chitin-Oberflächen durchgeführt. So konnten wir zeigen, dass die in *U. maydis* produzierten Nanobodies auf Chitin immobilisiert werden und so das Antigen „fischen“ können (**Abb. 3**). Demnach eignet sich *U. maydis* für die Produktion von Chitin-immobilisierbaren diagnostischen Nanobodies. Derzeit sind jedoch die Ausbeuten des Systems noch nicht kompetitiv, sodass weitere Optimierungsschritte nötig sind. Alternativ könnten zumindest kleine Fusionskonstrukte auch im bakteriellen Alleskönner *Escherichia coli* her-

gestellt werden. Wir streben jedoch in *U. maydis* auch eine weitere Multimerisierung der Nanobodies an. So können Nanobodies mit neuen Bindeeigenschaften erzeugt sowie die simultane Bindung unterschiedlicher Antigene erzielt werden. Hier könnte sich die Nutzung der unkonventionellen Sekretion, bei der wir auch sehr große Proteine ausschleusen können, als entscheidender Vorteil erweisen.

Chitin-immobilisierte Nanobodies – zukünftige Anwendungen

Die Covid-19-Pandemie hat aufgezeigt, wie wichtig eine frühzeitige Virusdiagnostik ist. Die Corona-Schnelltests, laterale *flow-tests*, die den Virus beispielsweise in Speichel oder Nasensekret immunologisch nachweisen können, spielten eine tragende Rolle bei der Verfolgung der Infektionen. Um für die



▲ **Abb. 3:** Nanobody-Immobilisierung auf Chitin. **A**, Aufbau eines Schwereketten-Antikörpers. **B**, Fusionsproteine aus Cts1 (gelb) und Anti-RBD-Nanobodies können die RBD sowie intakte Viren binden und detektieren. **C**, Die Nutzung des Cts1-Shuttles ermöglicht eine Immobilisierung an Chitinoberflächen. **D**, Chitin-immobilisierte Nanobody-Cts1-Fusionsproteine binden quantitativ die RBD (modifiziert von [7]).

Zukunft gerüstet zu sein, sollten daher neue Strategien für die schnelle Entwicklung von kostengünstigen Tests konzipiert werden. Die Kombination aus Nanobodies, deren Bindespezifität sich besonders schnell an neue Antigene anpassen lässt, und Immobilisierung auf kostengünstigem Chitin, das z. B. in Form von Krabbenschalenchitin als Abfallprodukt anfällt, könnte sich dabei als ein tragfähiges Konzept herausstellen. Neben der Verwendung von Chitinpartikeln mit immobilisierten Nanobody-Fusionsproteinen in *lateral-flow-tests*, in denen bislang meist Goldpartikel zur Detektion zum Einsatz kommen [9], wären sogar *lab-on-a-chip*-Anwendungen denkbar. Auch könnte die Strategie der Antigendetektion mittels kostengünstiger Einmaltests auf andere Lebensbereiche wie die Landwirtschaft (z. B. Schädlingsfrüherkennung) ausgedehnt werden.

Danksagung

Die Autoren danken Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die langjährige Unterstützung und Dr. Lisa Müller und Dr. Marcel Andréé aus dem Team von Prof. Dr. Heiner Schaal für die Charakterisierung der Sars-CoV-2-Nanobodies gegen aktive Viren im Säugerzellsystem. ■

Literatur

- [1] Wierckx N, Miebach K, Ihling N et al. (2021) Perspectives for the application of Ustilaginaceae as biotech cell factories. *Essays Biochem* 65: 365–379
- [2] Reindl M, Stock J, Hussnaetter KP et al. (2019) A potential lock-type mechanism for unconventional secretion in fungi. *Int J Mol Sci* 20: 460
- [3] Stock J, Sarkari P, Kreibich S et al. (2012) Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* 161: 80–91
- [4] Muyldermans S (2013) Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82: 775–797
- [5] Koenig PA, Das H, Liu H et al. (2021) Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science* 371: eabe6230
- [6] Walter JD, Hutter CAJ, Zimmermann I et al. (2020) Sybodies targeting the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. *bioRxiv*, DOI: 2020.04.16.045419

- [7] Philipp M, Müller L, Andréé M et al. (2023) Efficient virus detection utilizing chitin-immobilized nanobodies synthesized in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* 366: 72–84
- [8] Langner T, Öztürk M, Hartmann S et al. (2015) Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 14: 846–857
- [9] Zhang Y, Chai Y, Hu Z et al. (2022) Recent progress on rapid lateral flow assay-based early diagnosis of COVID-19. *Front Bioeng Biotechnol* 10: 866368

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende

nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Kerstin Schipper
 Institut für Mikrobiologie
 Heinrich-Heine-Universität
 Universitätsstraße 1
 D-40225 Düsseldorf
 kerstin.schipper@hhu.de
www.mikrobiologie.hhu.de/forschung/biotechnologie

AUTORINNEN UND AUTOREN



Simon Wegmann, Kerstin Schipper, Joana Pohlentz (v. l. n. r.), Einzelbild: Magnus Philipp

Die Arbeitsgruppe um Dr. Kerstin Schipper beschäftigt sich seit 2011 mit Pilz-Biotechnologie und ist im Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf angesiedelt. In enger Zusammenarbeit mit den anderen Gruppen des Instituts werden Erkenntnisse der Grundlagenforschung in biotechnologischen Projekten angewendet und weiterentwickelt. Neben der unkonventionellen Sekretion stehen Biomasse-Valorisierung, die Optimierung von mikrobiellem Öl als Palmölersatz und die Nutzung von mikrobiellen Konsortien für die Produktion derzeit im Fokus. Der Erstautor der Studie, Dr. Magnus Philipp, ist seit Kurzem PostDoc an der Norwegian University of Science and Technology.