

Die erste künstliche Zelle – ein revolutionärer Schritt für die synthetische Biologie?

Uwe T. Bornscheuer*

Biosynthese · Genomik · Gentechnik · Naturstoffe ·
Synthetische Biologie

Nachdem es ihm als erstem Wissenschaftler gelungen war, das Humangenom zu sequenzieren,^[1] hat Craig Venter mit seinem Team nun wiederum über eine herausragende Leistung berichtet: die Erschaffung des ersten selbst-vermehrten künstlichen Mikroorganismus.^[2] Wie wurde dies erreicht und was bedeutet es für die Chemie?

Ausgangspunkt war die Sequenzierung des kompletten Genoms des Mikroorganismus *Mycoplasma genitalium*,^[3] eines der kleinsten Genome. Die chemische Synthese dieses Genoms (582970 Basenpaare, bp) durch das Venter-Team war die erste Synthese eines gesamten Genoms überhaupt.^[4] Bereits dies war ein Meilenstein, da eine Reihe anspruchsvoller Methoden entwickelt werden musste, um das Vollhängengenom aus sehr kurzen DNA-Bausteinen zu erhalten. Hierzu wurden zunächst 10^4 Oligonukleotide (jedes bestehend aus 50 Nukleotiden) zu 101 Kassetten (jede ca. 6 kb lang) zusammengefügt und anschließend zu längeren Abschnitten durch enzymatische In-vitro-Methoden gefolgt von der In-vivo-Rekombination – zunächst in *Escherichia coli* und abschließend in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* – kombiniert.

Um nun aus der „toten“, chemisch hergestellten DNA einen selbst-vermehrten künstlichen Organismus zu schaffen, musste das Venter-Team Methoden für die Extraktion intakter Chromosomen aus der Hefe und zur Transplantation dieses Genom in eine neue „DNA-befreite“ Wirtzelle erfinden. Hierfür wurde eine Unterspezies von *Mycoplasma capricolum* als Empfänger ausgewählt. Das in der aktuellen Studie hergestellte synthetische Genom von *M. mycoides* JCVI-syn1.0 ist 1.08 Millionen Basenpaare (Mbp) groß. Es wurde wiederum aus synthetischen DNA-Oligonukleotiden durch Kombination von Kassetten aus zunächst 10-kb-Fragmenten und dann 100-kb-Intermediaten mit schließlicher Komplettierung des Vollhängengenoms in Hefe erzeugt (Abbildung 1). Dieses synthetische Genom wurde im nächsten Schritt in die Empfängerzelle *Mycoplasma capricolum* transplantiert. Anschließend konnte gezeigt

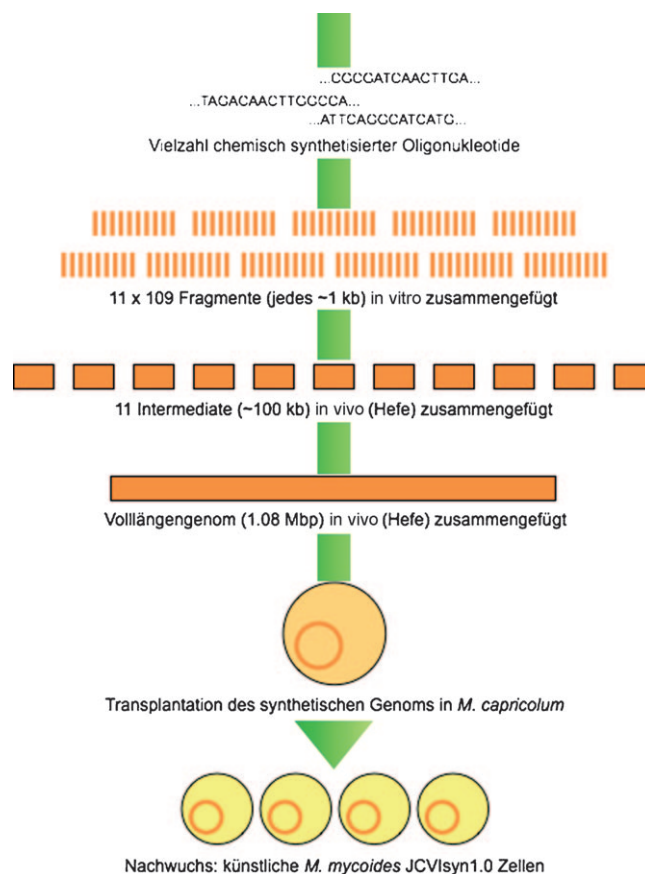


Abbildung 1. Vorgehensweise zur Schaffung der künstlichen Zelle.

werden, dass die Zellen, die das synthetische Genom enthalten, sich selbst vermehren können (und folglich die synthetische „DNA-Software“ ihre eigene *M. mycoides*-„Hardware“ im *M. capricolum*-Ersatzwirt bildet), logarithmisches Wachstum und einen typischen *Mycoplasma*-Phänotyp zeigen. Dies wurde durch Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie belegt. Zusätzlich bestätigten Proteomanalysen nahezu identische Proteinmuster mit Ausnahme von solchen Proteinen, die bewusst im synthetischen Genom verändert oder deletiert worden waren, um eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und synthetischem Stamm zu ermöglichen. Weitere wichtige Qualitätskontrollen waren die Einführung von „Wasserzeichen“ für eine spezifische Amplifizierung durch vier Primerpaare und Restriktionsmuster-

[*] Prof. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie, Abteilung Biotechnologie & Enzymkatalyse
Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-80066
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech>

analysen. Beide Kontrollen waren maßgeschneidert worden, um nur mit dem synthetischen Genom zu funktionieren.

Der Erfolg des Venter-Team ist ohne Zweifel herausragend, obwohl die Bedeutung der Resultate bereits heftig diskutiert wird.^[5] Die Einschätzungen reichen von einer Einordnung dieser Entdeckung in eine Linie mit Galileo, Kopernikus, Darwin und Einstein^[5c] bis hin zu deutlich kritischeren Ansichten, wonach dieses Verfahren in den meisten Laboren kaum anwendbar sei, die vorhandenen Methoden des Metabolic Engineering bereits nützlicher seien und die künstliche Zelle auch nur als normales Bakterium mit prosthetischem Genom erachtet werden kann.

Tatsächlich ist die Notwendigkeit einer sehr aufwändigen chemischen Synthese eines kompletten Genoms im ersten Schritt, an den sich dann Modifizierungen beispielsweise durch Einfügen von Genen für die Biosynthese eines neuen Produkts in der Wirtzelle anschließen, weiterhin eine Herausforderung. Selbst der Einbau einer Handvoll von Fremdgenen in einen Wirtorganismus zur Etablierung eines neuen Stoffwechselweges ist derzeit alles andere als einfach, da der Teufel im Detail steckt: Werden alle Proteine funktionell exprimiert? Wie können diese reguliert werden? Wie kann die Lokalisation der Proteine in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle gesteuert werden? Verläuft der Kohlenstofffluss in die gewünschte Richtung? Sind ausreichend Reduktionsäquivalente vorhanden etc.? Wissenschaftler im Bereich Metabolic Engineering und der synthetischen Biologie ringen immer noch mit diesen Problemen, obwohl beachtliche Fortschritte in den „Omics“-Technologien (Genomics, Proteomics, Metabolomics, Fluxomics etc.), der Bioinformatik, der Molekularbiologie und verwandten Disziplinen erzielt wurden.

Nur die Zukunft wird uns sagen können, ob der Beitrag des Venter-Teams nur ein Schritt vorwärts oder ein großer Sprung ist, vielleicht gar der wichtigste Durchbruch des 21. Jahrhunderts. Ein Blick in die Vergangenheit zeigt, dass die erste erfolgreiche Transformation von fremder DNA in den Mikroorganismus *E. coli*^[6] die Basis der modernen Biotechnologie bildete und die Entstehung eines ganzen Industriezweigs begründete. Nur wenige Jahre vergingen, bis die ersten kommerziellen Produkte wie Insulin oder Waschmittelproteasen rekombinant im Industriemaßstab hergestellt werden konnten. Im Gegensatz hierzu waren die Erwartungen sehr hoch, als das Humangenom komplett sequenziert worden war,^[1] und Wissenschaftler glaubten, dass wir sehr nahe an der Heilung zahlreicher Genkrankheiten sind. Zehn Jahre später haben wir gelernt, dass das Lesen eines Bauplans des Humangenoms nicht gleichzusetzen ist mit dem Verständnis des Inhalts und erst Recht nicht mit dessen Interpretation. Gleichmaßen bedeutet der Zusammenbau eines Flugzeuges aus Hunderttausenden von Teilen nicht, dass wir verstehen, warum es fliegt und wie wir es fliegen können. Was würde passieren, wenn wir Teile entfernen oder hinzufügen?

Beim Vergleichen der Entdeckung des Venter-Teams mit der Chemie sehe ich einige Parallelen zur organischen Totalsynthese, sowohl bezüglich der Motivation als auch des angestrebten Resultates. Die treibenden Kräfte in der mehrstufigen Totalsynthese komplexer Naturstoffe^[7] sind: 1) der erste Wissenschaftler zu sein, der die Totalsynthese bewerk-

stelligt, 2) ein Produkt herzustellen, das identisch mit dem Naturstoff ist, und 3) Methoden zu entwickeln, die es erlauben, die Syntheseroute zu verändern, um Analoga des Naturstoffs mit beispielsweise einem breiteren Anwendungsspektrum als Wirkstoff herzustellen.

Ein sehr wichtiges „Nebenprodukt“ der zahlreichen historischen Beispiele der Totalsynthesen war die Entwicklung einer Vielzahl von neuen Synthesemethoden, um die Anforderungen an eine exakte Struktur und Stereochemie zu erreichen. Zum Beispiel führte die erste Totalsynthese von Vitamin B12 zu neuen Bindungsknüpfungsmethoden, Hypothesen zur Biogenese und den Prinzipien der Orbitalsymmetrie.^[8] In ähnlicher Weise mussten für Venters Erfolg komplexe Methoden für die chemische Totalsynthese des künstlichen Genoms, für Methoden zur In-vitro und In-vivo-Kombination von DNA-Fragmenten, für eine anspruchsvollen Qualitätskontrolle, für die Genomtransplantation und schließlich für die Schaffung der selbst-vermehrenden künstlichen Zelle entwickelt werden.

Weiter besteht eine Analogie zwischen der Totalsynthese und der synthetischen Biologie darin, dass selbst der kleinste Fehler nicht toleriert wird. Ein erheblicher Zeitverzug wurde bei der Arbeit von Venter durch eine einzige Basenpaar-deletion (also weniger als 1 ppm oder 0.0001 % im 1.08-Mbp-Genom) verursacht. Diese trat in einem essentiellen Gen auf und verursachte eine Verschiebung des Leserahmens, was das gesamte Projekt aufhielt, bis der Fehler gefunden worden war. Ähnlich kann eine einzige falsche absolute Konfiguration eines Chiralitätszentrums in einem komplexen Naturstoff eine Verringerung oder sogar einen Verlust der biologischen Aktivität der Verbindung bewirken (z. B. enthält die Grundstruktur von Erythromycin zehn Chiralitätszentren, es sind also $2^{10} = 1024$ Diastereomere möglich).

Trotzdem werden alle Methoden, die vom Venter-Team auf dem Weg zum Erfolg entwickelt wurden, für andere Wissenschaftler sehr nützlich sein, auch wenn diese nur einen komplexen biologischen Stoffwechselweg (z. B. einen Polyketidsynthese-Weg) in einem Wirtorganismus etablieren möchten. Ein kürzliches Beispiel für die mikrobielle Herstellung von Biokraftstoffen und Chemikalien aus Fettsäuren zeigte,^[9] dass wir nicht weit von einer Alternative zur zukünftigen Versorgung mit Energie, Kraftstoffen und Chemikalien entfernt sind, bei der die moderne Biotechnologie begünstigt durch die synthetische Biologie zur Schlüsseltechnologie werden kann. Ein erfolgreicher Transfer der vom Venter-Team entwickelten Methoden zu komplexeren Standard-Wirtorganismen wie *E. coli* oder Hefen wird sicherlich diese Entwicklung beschleunigen. Hürden, wie die chemische Synthese der deutlich größeren Genome dieser Organismen, dürften in Anbetracht sinkender Kosten für die Synthese der DNA-Bausteine und einer schnelleren Qualitätskontrolle durch Sequenzierung in Kombination mit weiterer Automatisierung sehr wahrscheinlich überwunden werden. Ohne Zweifel wird das Metabolic Engineering gut untersuchter Mikroorganismen die Methode der Wahl bleiben; zumindest für die nahe Zukunft.

Die bereits diskutierten befürchteten Risiken für den Missbrauch der vom Venter-Team entwickelten Technologien können derzeit als minimal eingestuft werden, da nur eine

Handvoll Forscher weltweit die Ausstattung haben, um auf diesem Gebiet zu arbeiten. Zusätzlich stehen Standardmethoden (für zufällige oder gerichtete) Mutagenese und Metabolic Engineering bereits zur Verfügung und sind wesentlich einfacher durch „Schurken“ einzusetzen. Ich bin auch überzeugt, dass wir sehr weit von der Möglichkeit entfernt sind, höhere Lebensformen wie das Mammot oder den Neanderthaler aus synthetischer DNA zu erschaffen – eine „Möglichkeit“, die sich ohnehin aus ethischen Gründen verbietet.

Zusammenfassend hat das Venter-Team ohne Zweifel einen bedeutenden technologischen Durchbruch erzielt. Es muss sich aber erst noch zeigen, ob sich dieser in naher Zukunft zu einer Schlüsselmethode für die Versorgung der Menschheit mit Kraftstoffen, Energie und Chemikalien entwickeln wird und ob diese Methode dann zu bestehenden Verfahren der synthetischen Biologie und des Metabolic Engineering konkurrenzfähig sein wird.

Eingegangen am 4. Juni 2010

Online veröffentlicht am 25. Juni 2010

-
- [1] a) J. C. Venter, M. D. Adams, G. G. Sutton, A. R. Kerlavage, H. O. Smith, M. Hunkapiller, *Science* **1998**, 280, 1540; b) J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304.
 [2] D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-

- Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z. Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison III, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* **2010**, DOI: 10.1126/science.1190719.
 [3] C. M. Fraser, J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley, R. D. Fritchman, J. F. Weidman, K. V. Small, M. Sandusky, J. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, D. M. Sauddek, C. A. Phillips, J. M. Merrick, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, K. F. Bott, P. C. Hu, T. S. Lucier, S. N. Peterson, H. O. Smith, C. A. Hutchison III, J. C. Venter, *Science* **1995**, 270, 397.
 [4] D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas, M. A. Algire, C. Merryman, L. Young, V. N. Noskov, J. I. Glass, J. C. Venter, C. A. Hutchison III, H. O. Smith, *Science* **2008**, 319, 1215.
 [5] a) Anonymous, *Nature* **2010**, 465, 397; b) A. Katsnelson, *Nature* **2010**, 465, 406; c) D. Deamer, M. Bedau, G. Church, S. Rasmussen, A. Caplan, S. Benner, M. Fussenegger, J. Collins, *Nature* **2010**, 465, 422.
 [6] a) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 1293; b) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 3240.
 [7] Siehe z.B.: a) K. C. Nicolaou, E. J. Sorensen, *Classics in Total Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**; b) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Classics in Total Synthesis II*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
 [8] A. Eschenmoser, C. E. Wintner, *Science* **1977**, 196, 1410.
 [9] E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. Del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* **2010**, 463, 559.