

# Auf dem Weg zu chemisch veränderten Organismen mit genetischer Firewall\*\*

Carlos G. Acevedo-Rocha und Nediljko Budisa\*

Gerichtete Evolution · Nucleobasen · Synthetische Biologie · Xenobiologie

Lebende Systeme sind chemische „Maschinen“, die durch ein genetisches Programm mit standardisierten Verbindungen und kontrollierten chemischen Prozessen gesteuert werden. Eine der wichtigsten Aufgaben für Wissenschaftler liegt heute darin, einen Weg zur Erweiterung des chemischen Standardrepertoires lebender Zellen zu finden. Dies kann unter anderem durch gezielte künstliche Evolution von Organismen mit neuartiger chemischer Zusammensetzung erreicht werden. Die resultierenden Zellen müssen lebensfähig und robust im Hinblick auf Wachstum und Replikation sein, um eine unbegrenzte Zeit in genetischer Isolation von natürlichen Arten existieren zu können. Allerdings ist diese Aufgabe anspruchsvoll, da alle derzeit bekannten Zellen die Organisation der Stoffwechselwege und Informationsverarbeitung sowie einen Standardsatz von Makromolekülen (Nukleinsäuren, Proteine, Fettsäuren) gemeinsam haben. Diese Bausteine sind z.B. die 20 kanonischen Aminosäuren für die Proteinbiosynthese oder vier Typen kanonischer Nukleotide im Fall der DNA als genetisches Material: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Darüber hinaus ermöglicht die Universalität des genetischen Codes den horizontalen Gentransfer über Artgrenzen hinweg. Wegen dieses hohen Grads an Standardisierung und Vernetzung sind grundlegende chemische Veränderungen in lebenden Systemen im Allgemeinen tödlich.<sup>[1]</sup>

Der Durchbruch von Marlière et al., von dem in diesem Highlight berichtet wird, ist der erste erfolgreiche Versuch, die kanonische/nichtkanonische chemische Barriere durch künstlich evolvierte Bakterien mit einem chlorierten DNA-Genom zu überwinden.<sup>[2]</sup> Die Autoren haben gezeigt, dass T durch sein nichtkanonisches Analogon 5-Chloruracil ( $\chi$ ) im Genom von *Escherichia coli* ersetzt werden kann und die Nachkommen dieser Bakterien die Fähigkeit erworben

haben,  $\chi$  zu verwenden. Dies wurde mithilfe gezielter Modifikationen des T-Biosynthesewegs und durch erfolgreiche Zuchtwahl von robusten *E. coli*-Varianten mit der Fähigkeit zum Wachstum auf  $\chi$  erreicht. Die Wahl von  $\chi$  beruht auf früheren Berichten, die gezeigt haben, dass 1)  $\chi$  in DNA eingebaut wird,<sup>[3a]</sup> 2)  $\chi$ :A-Basenpaare stabil sind<sup>[3b]</sup> und 3)  $\chi$  durch die Komponenten des T-Biosynthesewegs in *E. coli* problemlos metabolisiert wird.<sup>[3c]</sup> Ein weiterer Vorteil ist, dass T die einzige DNA-Base ist, die keine Verwendung im RNA-Metabolismus findet. Zusätzlich war es Marlière et al. schon früher gelungen, mit einer Evolutionsmethode für neue Lebensformen stark oligotrophe *E. coli*-Zellen zu erzeugen, die in der Lage sind, auf kleinsten Spuren von T zu wachsen.<sup>[4]</sup> Das intrazellulär verfügbare Thymin wird normalerweise metabolisch zu Thymidintriphosphat (dTTP) als Baustein für die DNA umgewandelt. Allerdings kann auch  $\chi$  (als Ersatz für T) diesen Weg nutzen, um Chlordesoxyuridintriphosphat ( $d\chi$ TP) zu erzeugen, das danach enzymatisch in die DNA eingebaut wird.

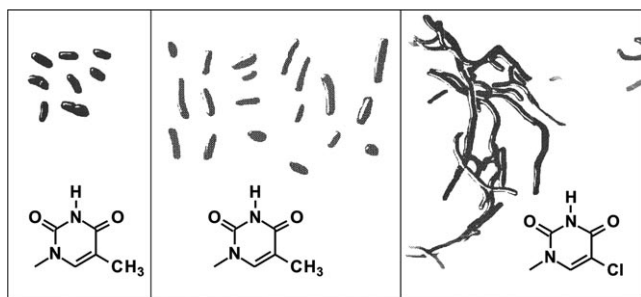
Experimentelle Evolution des *E. coli*-Stamms THY1 (ein Derivat des *E. coli*-K12-Stamms MG1655) unter drastischen und unter milden Bedingungen in Gegenwart von  $\chi$  ergab die Isolate CLU2 bzw. CLU4. Das Experiment wurde gestoppt, nachdem  $\chi$  als ausschließliches Substrat durch CLU2 und CLU4 verwendet wurde (nach 164 bzw. 166 Tagen); die anschließenden Analysen der DNA-Zusammensetzung zeigten ca. 90 % Desoxychloruridin ( $d\chi$ ) in beiden Stämmen. Die restlichen 10 % Desoxythymidin (dT) kamen aus einer eher unkonventionellen Quelle: In den meisten tRNA-Molekülen ist Uracil (unmethyliertes T) durch die S-AdoMet-abhängige 5-MeU-54-tRNA-Methyltransferase (codiert durch das Gen *trmA*) an Position 54 methyliert. Nach dem Knock-out dieses Gens im Stamm THY4 war die resultierende Variante THY5 in der Lage, allein auf  $\chi$  zu wachsen, was zu der Variante CLU5 führte, deren genomische DNA dT nur noch in Spuren (1.6 %) enthält. Diese „Restkontamination“ beruht wahrscheinlich auf anderen RNA oder DNA modifizierenden Enzymen. Abbildung 1 zeigt die Morphologie der natürlichen DNA-haltigen Stämme sowie der Bakterien mit chloriertem Genom.

Wenn ein Organismus einer neuen Umgebung ausgesetzt ist, kann er sich nur an sie anpassen, indem er Enzyme und Proteine, die ursprünglich als Reaktion auf ganz andere Umweltbedingungen entwickelt wurden, massiv ändert.<sup>[5]</sup> Zur Untersuchung dieser Prozesse sind Langzeitkulturexperi-

[\*] Dr. C. G. Acevedo-Rocha, Prof. Dr. N. Budisa  
Arbeitskreis Biokatalyse, Institut für Chemie  
Technische Universität Berlin  
Franklinstraße 29, 10587 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: budisa@biocat.tu-berlin.de  
Homepage: <http://www.biocat.tu-berlin.de>

Dr. C. G. Acevedo-Rocha  
Arbeitskreis Reetz, Institut für Chemie  
Philipps-Universität Marburg (Deutschland)

[\*\*] Wir sind Dr. Michael G. Hösl und Dr. Lars Merkel dankbar für die kritische Durchsicht des Manuskripts und zahlreiche produktive Diskussionen zu diesem Thema.



**Abbildung 1.** Marlière-Mutzel-Experiment – chemische Evolution eines bakteriellen Genoms.<sup>[2]</sup> Graphische Darstellung der Morphologie der *E. coli*-Zellen, abgeleitet aus den Stämmen THY1 (links), THY5 (Mitte) und CLU5 (rechts). Die Grafiken wurden auf Basis von Mikroskopaufnahmen erstellt, die uns R. Mutzel und P. Marlière freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben. Der ursprüngliche Stamm THY1 ist stäbchenförmig, während der evolvierte, 5-Chloruracil-resistente Stamm je nach Nährstoff im Medium zwei Formen annimmt: Während die THY5-Zellen in Thymin-haltigem Medium eine leicht längliche Stäbchenform haben (Mitte), resultieren aus dem Wachstum auf 5-Chloruracil (CLU5) Zellkonglomerate mit langer, fadenähnlicher Form mit unregelmäßiger Dichte. Die Morphologieveränderungen sind wahrscheinlich auf Veränderungen in der Dynamik der Zellteilung zurückzuführen.

mente mit schnell wachsenden asexuellen Bakterienzellen das Mittel der Wahl. Dem Pionier auf diesem Gebiet, Richard Lenski, und seiner Arbeitsgruppe gelang die Zucht von 2000,<sup>[6a]</sup> 10000,<sup>[6b]</sup> 20000<sup>[6c]</sup> und 40000<sup>[6d]</sup> *E. coli*-Generationen in serieller Kultur. Allerdings ist dieses Verfahren technisch mühsam und zeitaufwändig; Verunreinigungen und diskontinuierliches Wachstum sind schwer zu vermeiden. In konventionellen kontinuierlichen Kulturapparaturen dagegen überdauern meist unerwünschte verdünnungsresistente, adhäsive Varianten als Biofilm an den inneren Oberflächen der Kulturapparatur. Marlière et al. haben diese Schwierigkeiten durch die Erfindung eines ausgeklügelten Geräts, genannt „Gen-Automat“ oder „Genemat“ (eine Art „automatisierter Lenski-Apparat“), elegant umgangen.<sup>[4b]</sup> Der Genemat zur permanenten Proliferation von Zellen in Suspension ermöglicht abwechselndes Wachstum in einem von zwei Kulturgefäßen, die wiederum abwechselnd sterilisiert werden, sodass adhäsive Varianten eliminiert werden. Dabei werden zwei Arten von Medium zugeführt: „permissives“ Medium (mit kanonischen Metaboliten) und wachstumshemmendes, „nichtpermissives“ oder Stressmedium (mit nichtkanonischen Metaboliten). Als Schwellwert ist eine Zelldichte von  $10^9$  Zellen pro Milliliter gesetzt. Die Wachstumszyklen werden automatisch von einem einfachen Algorithmus gesteuert: Wenn die optische Dichte der Kultur unter einen Schwellwert fällt, wird permissives Medium zugeführt und umgekehrt.

Mit dem Genemat gelang Marlière et al.<sup>[2]</sup> die schrittweise Anpassung von *E. coli*, beginnend mit permissivem Medium mit T und endend mit robustem Wachstum in nichtpermissivem Medium mit dem T-Ersatz  $\chi$ . Die beiden Stämme CLU2/4 behielten jedoch die Fähigkeit, sich unbegrenzt auf T mit einer ähnlichen Wachstumsrate wie auf  $\chi$  zu vermehren. Durch anschließendes Wachsen der  $\chi$ -angepassten CLU2- und CLU4-Stämme in Gegenwart von T konnten sie die

Stämme THY2 bzw. THY4 erzeugen. Die interessanteste Erkenntnis ist aber die, dass die Stämme THY2/4 in der Lage sind, ohne anpassungsbedingte Verzögerung ihr Wachstum in  $\chi$ -haltigem Medium gleich fortzusetzen. Im Unterschied dazu kann der CLU2-Stamm in Gegenwart von T nur nach einer Adaptationsphase wachsen.<sup>[2]</sup> Wesentlich ist, dass die Fähigkeit zum Aufbau chlorierter DNA im Genom der Stämme THY2/4 durch weitreichende Mutation und Umarrangements des Genoms manifestiert wurde: DNA-Sequenzanalysen ergaben 1514 Substitutionsmutationen und mindestens eine 150 Kilobasendeletion für THY2 sowie mehrere Mutationen und einen 20-prozentigen Genomumbau (846 Kilobasen) für THY4. Dieses Experiment zeigt in einer bemerkenswerten Art und Weise, dass die Anhäufung verschiedener Arten von Mutationen umfangreiches Umschreiben eines großen Teils des Genoms erfordert. Die praktische Anwendung dieser Stämme könnte sich aus den neuen biosynthetischen Eigenschaften der mutierten Enzyme in den zugehörigen Stoffwechselwegen oder aus der weiteren Evolution der entwickelten Bakterien als Ganzzellkatalysatoren für spezifische Zwecke ergeben.

Die In-vivo-Einführung neuartiger chemischer Prozesse und Verbindungen, die nicht dem Standard entsprechen, ist eher begrenzt, da sie in der Regel nur kleine, vernachlässigbare Unterschiede im grundlegenden Aufbau der lebenden Zellen erlaubt.<sup>[1]</sup> Dieser Gedanke führt zur Annahme, dass eine Reprogrammierung der Zellen mit synthetischen Stoffen nicht mit der funktionalen Vielfalt „normaler“ Organismen (mit standardisierter Chemie), die während der natürlichen Evolution erzielt wurde, konkurrieren kann. Doch nun ergibt sich aus der Kombination von experimenteller Zuchtwahl,<sup>[6,7]</sup> chemischer Evolution<sup>[8]</sup> und natürlicher Gentechnik (genetische Mutationen, Rekombination, horizontaler Gentransfer usw.)<sup>[9]</sup> ein leistungsfähiges, zukunftsträchtiges Konzept zum Design von echten künstlichen Zellen mit neuen Funktionen, die in der natürlichen Evolution bisher nicht auftraten. Es ist bereits vorhergesagt worden, dass aus Zellpopulationen mit voll integrierten neuartigen chemischen Funktionalitäten neue, unerwartete Lebensformen und Eigenschaften entstehen würden.<sup>[1a,10a]</sup> Es sollte jedoch bedacht werden, dass die in dieser Studie entwickelten Bakterien zwar ein chloriertes Genom enthalten, aber immer noch die Fähigkeit für das Wachstum auf T aufweisen. Daher wird der nächste Schritt sein, eine vollständige metabolische/genetische Isolation zu erreichen, d.h. eine absolute Abhängigkeit von  $\chi$  mit begleitender metabolischer Indifferenz gegenüber T. Ebenso sollte die Verwendung von nichtkanonischen Aminosäuren und Nukleobasen nur der erste Schritt sein, um zelluläre chemische Zusammensetzungen zu ändern.<sup>[1]</sup> Danach könnten die funktionellen Eigenschaften lebender Systeme durch Erwerb von neuartigen chemischen Funktionalitäten über künstliche Evolution von bereits vorhandenen Zellen aus der „alten“, natürlichen Welt weiter diversifiziert werden. Eine wichtige Aufgabe für die chemisch-synthetische Biologie könnte die Durchführung der künstlichen Evolution von robusten, lebensfähigen und chemisch veränderten Zellen sein, die in der Lage sind, für eine unbegrenzte Zeit in Isolation von natürlichen Arten zu wachsen und sich zu vermehren. Eine umfassende genetische Isolation ist aber nur mit den Zellen

möglich, die „Xeno-DNA“ als genetisches Material enthalten oder alternative/unterschiedliche genetische Codes haben, um einen horizontalen Gentransfer über Artgrenzen hinweg zu verhindern. Auf diese Weise könnte eine genetische Firewall gegen die natürliche DNA-basierte Welt errichtet werden. Die Aspekte der Biosicherheit und Gefährlosigkeit dieser Möglichkeiten wurden erst vor Kurzem ausführlich beleuchtet.<sup>[10]</sup>

Es ist abzusehen, dass Experimente zur Veränderung der Interpretation des genetischen Codes (z.B. durch Codon-Emanzipation für neuartige Aminosäure-Zuordnungen) in naher Zukunft mit „Genematen“ durchgeführt werden könnten. Gerichtete Evolution von Bakterienstämmen sollte ebenfalls auf bekannte nichtkanonische DNA-Basenpaare ausweitend sein,<sup>[11]</sup> um die Codierungskapazität der Zellen zu erhöhen. Das Ziel ist letztlich ein integrativer Ansatz, der die gerichtete Evolution der künstlichen Zellen mit neuartigen genetischen Codes (inklusive erweiterten Codierungskapazitäten) und De-novo-Gestaltung metabolischer Biosynthesewege und Schaltkreise umfasst. Dabei werden nicht nur lebende Systeme mit neuen chemischen Zusammensetzungen bereitgestellt, sondern auch künstliche Zellen mit neuen Eigenschaften, die bisher nicht von der Natur hervorgebracht wurden.<sup>[1]</sup> Diese Entwicklungen werden die Tür zu einer parallelen biologischen Welt weit aufstoßen.

Eingegangen am 2. Mai 2011

Online veröffentlicht am 24. Juni 2011

- 
- [1] a) N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586–6624; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426–6463; b) N. Budisa, *Engineering the genetic code*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**; c) M. Hoesl, N.

Budisa, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2948–2955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2896–2902.

- [2] P. Marlière, J. Patrouix, V. Döring, P. Herdewijn, S. Tricot, S. Cruveiller, M. Bouzon, R. Mutzel, *Angew. Chem.* **2011**, DOI: 10.1002/ange.201100535; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, DOI: 10.1002/anie.201100535.
- [3] a) D. B. Dunn, J. D. Smith, *Biochem. J.* **1957**, *67*, 494–506; b) J. A. Theruvathu, C. H. Kim, D. K. Rogstad, J. W. Neidigh, L. C. Sowers, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7539; c) A. Munch-Petersen: *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms*, Academic Press, London and New York, **1983**.
- [4] a) V. de Crécy-Lagard, J. Bellalou, M. Bouzon, R. Mutzel, P. Marlière, *BMC Biotechnol.* **2001**, *1*, e10; b) P. Marlière, R. Mutzel, Patent DE 198 56 136 C2, **2002**.
- [5] a) G. Bell, *Selection: the Mechanism of Evolution*, Chapman & Hall, New York, **1996**; b) J. W. Drake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7160–7164.
- [6] a) R. E. Lenski, M. R. Rose, S. C. Simpson, S. C. Tadler, *Am. Nat.* **1991**, *138*, 1315–1341; b) R. E. Lenski, M. Travisano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6806–6814; c) R. E. Lenski, C. L. Winkworth, M. A. Riley, *J. Mol. Evol.* **2003**, *56*, 498–508; d) J. E. Barrick, D. S. Yu, S. H. Yoon, H. Jeong, T. K. Oh, D. Schneider, R. E. Lenski, J. F. Kim, *Nature* **2009**, *461*, 1243–1247.
- [7] a) S. F. Elena, R. E. Lenski, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 457–469; b) N. Philippe, E. Crozat, R. E. Lenski, D. Schneider, *Bioessays* **2007**, *29*, 846–860; c) A. Buckling, R. Craig Maclean, M. A. Brockhurst, N. Colegrave, *Nature* **2009**, *457*, 824–829.
- [8] S. J. Wrenn, P. B. Harbury, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 331–349.
- [9] J. A. Shapiro, *Mob. DNA* **2010**, *1*, 4.
- [10] a) P. Marlière, *Syst. Synth. Biol.* **2009**, *3*, 77–84; b) P. Herdewijn, P. Marlière, *Chem. Biodiversity* **2009**, *6*, 791–808; c) M. Schmidt, *BioEssays* **2010**, *32*, 322–331.
- [11] a) S. A. Benner, *Science* **2004**, *306*, 625–626; b) A. T. Krueger, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 242–248.