Biochemie und Molekularbiologie 2007

Modifizierte, künstliche Systeme der Replikation und der Regulation der Expression leisten wertvolle Beiträge zur synthetischen Biologie. Zum Proteindesign lassen sich evolutive und rationale Methoden verwenden, zunehmend auch kombinierte Ansätze, welche die Vorteile beider Methoden vereinen. Durchbruch bei der Stammzellforschung: Induzierte pluripotente Stammzellen könnten den Weg in Richtung Stammzelltherapie weisen.

Synthetische Biologie

◆ „Synthetische Biologie" beschrieb schon vor mehr als 25 Jahren rekombinante DNA-Technologien, in denen durch menschliche Intervention (synthetisch) Bakterien (Biologie) neue Eigenschaften erhielten. Daher war dieser Begriff lange gleichbedeutend mit Bioengineering. Heute reicht das Forschungsfeld der synthetischen Biologie von der Konstruktion neuer Organismen durch genetische Manipulation bis hin zur chemischen Synthese artifizieller Replikationssyteme.

In diesem Bericht werden wir uns auf ausgewählte Beispiele zur Entwicklung von artifiziellen Replikationssystemen und steuerbaren RNA-Schaltern beschränken. Zur Vertiefung sei auf sehr gute Übersichten verwiesen.[1–3)]

Um Darwinistische Evolution zu ermöglichen, müssen artifizielle Replikationssyteme ebenso wie das natürliche Vorbild DNA Information speichern und auf die Nachkommenschaften übertragen. Dies setzt eine verlässliche Erkennung durch Hybridisierung mit komplementären Systemen und die Weitergabe der Information durch templatgesteuerte Prozesse voraus.

Artifizielle Replikationssysteme

◆ Auf der Suche nach im Vergleich zur DNA vereinfachten genetischen Systemen beschrieben Eschenmoser et al. eine Nucleinsäure auf der Basis von α-L-Threose (TNA).[4)] Sie enthält eine im Vergleich zur DNA verkürzte Wiederholungseinheit, in der die Pentose 2'-Desoxyribose durch die Tetrose Threose ersetzt ist (Abbildung 1). TNA kann sowohl mit sich selbst als auch mit DNA und RNA paaren. Szostak et al. untersuchten, inwieweit sich TNA als Substrat für eine enzymatische Replikation eignet.[5,6)] Sie konnten eine DNA-Polymerase identifizieren, die TNA templatabhängig polymerisiert.

Meggers et al. berichteten von einer Nucleinsäure, die ein weiter vereinfachtes Rückgrat enthält und entwickelten daraus GNA (Glycerol-Nucleinsäure).[7)] Hier ersetzt eine offenkettige Glyceroleinheit das 2'-Desoxyribose-Rückgrat der DNA (Abbildung 1). GNA paart selektiv mit sich selbst und mit RNA, nicht jedoch mit DNA. Kürzlich berichteten Szostak et al., dass eine DNA-Polymerase GNA als Templat zur DNA-

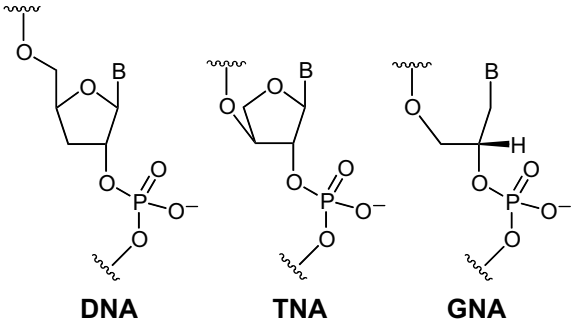

Abb. 1. ***Vergleich der Strukturen von DNA, TNA und GNA.***

Polymerisation verwendet.[8)] Dieser Informationstransfer erfolgt mit beachtlicher Selektivität. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit GNA durch enzymatische Synthese templatgesteuert erhalten werden kann.

Alle bekannten artifiziellen Replikationssysteme arbeiten bisher weniger effizient als mit dem natürlichen Substrat DNA – nicht weiter erstaunlich, wurden doch diese Systeme durch Evolution für die Verwendung von DNA optimiert. Gerichtete Evolution könnte ein viel versprechender Ansatz sein, effiziente nicht auf DNA basierende Systeme zu verbessern.

Riboswitches

◆ Neben artifiziellen Replikationssystemen zeichnet sich ein breites Einsatzgebiet für funktionale Ribo-

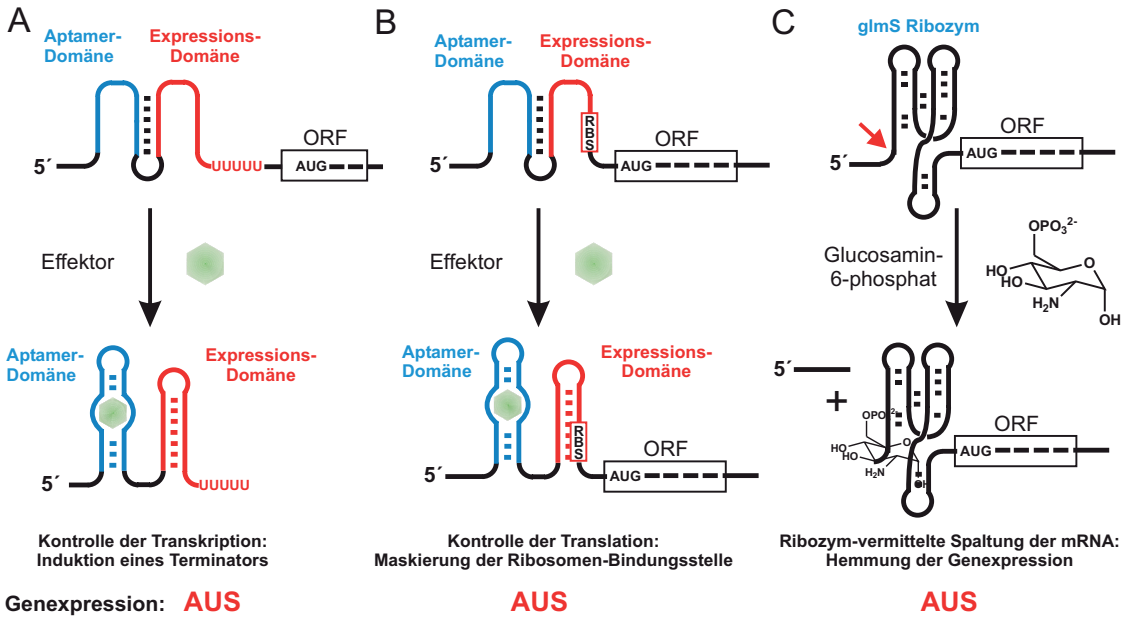

Abb. 2. Mechanismen natürlicher Riboswitches. A: Kontrolle der Expression auf Ebene der Transkription. B: Kontrolle der Initiation der Translation. C: Ribozymvermittelte Spaltung der mRNA im glmS-Schalter.

nucleinsäuren zur Regulation biologischer Funktionen ab. Mit synthetischer Biologie lassen sich beispielsweise einfache, programmierbare Schalter zur Regulation der Genexpression entwickeln. RNA eignet sich für diese Zwecke hervorragend, da es komplexe Aufgaben ohne Beteiligung von Proteinen erfüllen kann. Beispielsweise entdeckten Breaker und Mitarbeiter vor wenigen Jahren, dass eine Feinregulation der Genexpression in Bakterien durch direkte Interaktion von Metaboliten mit Boten-RNA möglich ist.[9] Bei diesen Riboswitches binden bestimmte Elemente der mRNA ein niedermolekulares Stoffwechselprodukt. Dies führt zu einer veränderten Expression relevanter Gene: Beispielsweise wird in vielen Fällen die Biosynthese der entsprechenden Metaboliten im Sinne einer Rückkopplung gedrosselt. Beispiele für regulatorisch aktive Liganden sind etwa die Purin-Nucleobasen und Derivate, einige Aminosäuren sowie eine Reihe von Co-Faktoren wie TPP, SAM, Cobalamin und FMN.[9] Die RNA-basierten Systeme ermöglichen eine Feinabstimmung der Genexpression in Abhängigkeit von der Effektor-Konzentration ohne regulatorische Proteine. Natürlich vorkommende Riboswitches erfüllen viele der Anforderungen, die an Systeme der synthetischen Biologie gestellt werden. Zum einen sind sie wegen fehlender Proteine weniger komplex, zum anderen gehorchen sie allgemeinen Designprinzipien und besitzen einen hochgradig modularen Aufbau (Abbildung 2).

Artifizielle RNA-Schalter

◆ In jüngster Zeit hat es einige interessante Ansätze gegeben, ähnliche RNA-basierte Schalter de novo zu konstruieren. Ein Vorteil solcher Systeme liegt in der Entkopplung der Schalter von den Restriktionen des Stoffwechsels der Zelle. Beispielsweise gelang die Konstruktion von Schaltelementen, die durch das Purin-Derivat Theophyllin ausgelöst werden. Theophyllin wird in Zellen, außer in einigen Pflanzen, weder synthetisiert noch abgebaut – ein wichtiges Kriterium für einen Effektor zur externen Kontrolle der Genexpression.

Süß, Hillen et al. versahen eine mRNA in *Bacillus subtilis* mit einem theophyllinbindenden Aptamer und konstruierten so einen Schalter, der die Expression bei Zugabe von Theophyllin reduziert.[10] Die umgekehrte Reaktivität, nämlich die Induktion der Expression durch Theophyllin, gelang der Gruppe von Gallivan in *Escherichia coli* (Abbildung 3a).[11] In einer weiterführenden Studie nutzten Gallivan und Mitarbeiter diesen RNA-Schalter, um eine komplexe Aufgabe zu meistern: Sie koppelten den theophyllinabhängigen RNA-Schalter an die Expression eines Proteins, welches die Bewegung der bakteriellen Flagellen kontrolliert und konstruierten so ein synthetisches Bakterium mit einer artifiziellen Chemotaxis.[12] Als Chemotaxis bezeichnet man die gerichtete Bewegung entlang von Konzentrationsgradienten bestimmter Reizstoffe.

Bei Abwesenheit von Theophyllin ist das Bakterium unfähig, sich vorwärts zu bewegen und führt unkoordinierte Taumelbewegungen aus. Bei Kontakt mit Theophyllin wird das Protein exprimiert, dieses führt zu einer gerichteten Vorwärtsbewegung. Auf diese Weise bewegen sich derart umprogrammierte Bakterien entlang von Pfaden des artifiziellen Lockstoffes Theophyllin. Diese Anwendung zeigt, wie RNA-basierte Schaltelemente Ziele erreichen können, die mit proteinbasierten Techniken nur schwer zu realisieren wären.

Mechanismen zur Kontrolle der Genexpression

◆ Natürlich vorkommende RNA-Schalter kontrollieren die Genexpression, indem sie die Elongation der Transkription oder die Initiation der Translation beeinflussen. Eine Ausnahme ist ein katalytisch aktives RNA-Motiv (ein Ribozym) in der mRNA des Gens glmS.[13] Der regula-

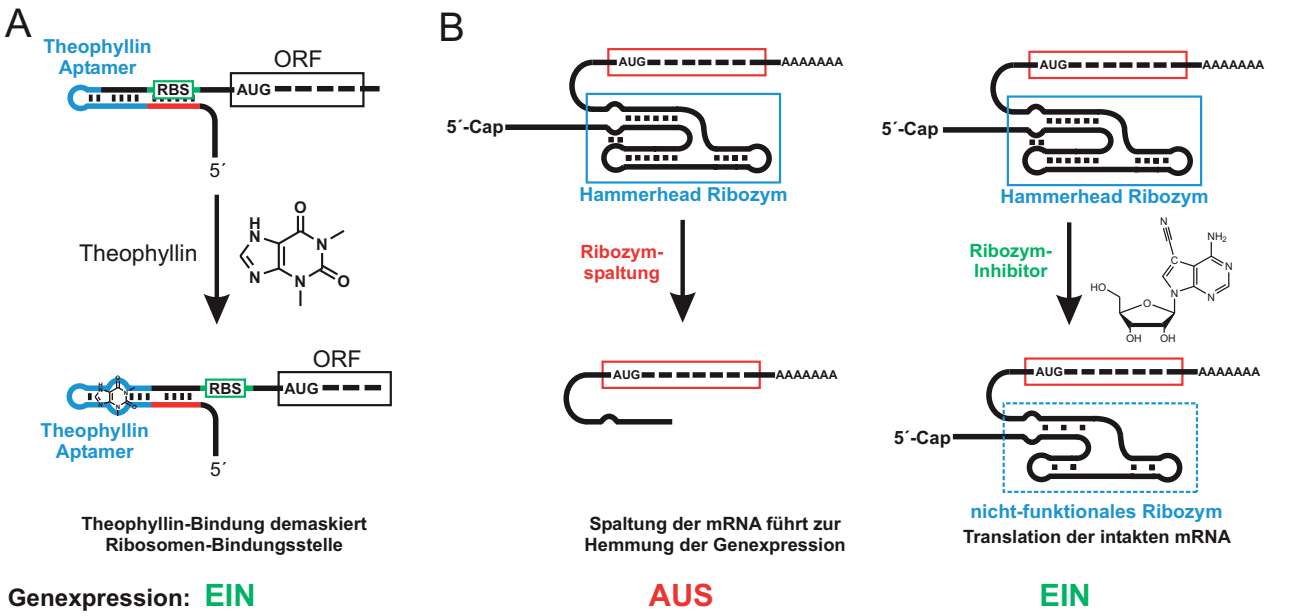

Abb. 3.
Beispiele für artifizielle Riboswitches. A: Translationskontrolle durch Befreiung der Ribosomen-Bindungsstelle. B: Kontrolle durch Hammerhead-Ribozym-vermittelte Spaltung der mRNA.

torisch aktive Effektor, Glucosamin-6-phosphat, wird von der mRNA gebunden und dient als Co-Faktor für die autokatalytische Spaltung der RNA. Dies hemmt die Genexpression (Abbildung 2c).

Kürzlich realisierten Mulligan und Mitarbeiter artifizielle Systeme auf Basis von phosphodiesterspaltenden Ribozymen: Sie benutzten dazu ein in die mRNA eingefügtes Hammerhead-Ribozym, um in Säugerzellen die Genexpression zu reduzieren.[14] Ribozym-Inhibitoren ermöglichen eine ligandengesteuerte Reaktivierung der Expression (Abbildung 3b). Am wirksamsten zeigte sich hier das Nucleosid-Analogon Toyocamycin. Der Einbau des Analogons in die zelluläre mRNA inaktiviert das Ribozym und aktiviert dadurch die Expression. Obwohl dieser Art der Kontrolle ein sehr unspezifischer Mechanismus zugrunde liegt, gelang die Regulation der Genexpression mit dem Hammerhead-Ribozym sogar im Mausversuch.[14]

Ein verallgemeinertes Design einer solchen ribozymbasierten Strategie gelang unlängst der Gruppe um Smolke. Sie fügten eine Fusion eines Ribozyms und eines Aptamers (Aptazyme) in die mRNA ein.[15] Durch geschicktes Design des Aptazymes gelang es, die Spaltungsaktivität und dadurch die Genexpression durch die Zugabe des Aptamer-Liganden zu regulieren.

Die vorgestellten Beispiele zeigen exemplarisch, dass sich Nucleinsäuren generell gut für die Realisierung komplexer Funktionen eignen. Modifizierte, artifizielle Systeme der Replikation oder der Regulation der Expression leisten somit einen wertvollen Beitrag für die synthetische Biologie.

Andreas Marx, Jörg S. Hartig
Universität Konstanz

1) *http://syntheticbiology.org*
2) *A. C. Forster, G. M. Church,* Gen. Res. *2007*, 17, *1.*
3) *F. J. Isaacs, D. J. Dwyer, J. J. Collins,* Nat. Biotechnol. *2006*, 24, *545.*
4) *K. Schoning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser,* Science *2000*, 290, *1347.*
5) *J. C. Chaput, J. K. Ichida, J. W. Szostak,* J. Am. Chem. Soc. *2003*, 125, *856.*
6) *J. K. Ichida,K. Zou, A. Horhota; B. Yu, L. W. McLaughlin, J. W. Szostak,* J. Am. Chem. Soc. *2005*, 127, *2802.*
7) *L. Zhang, A. E. Peritz, E. Meggers,* J. Am. Chem. Soc. *2003*, 125, *9274.*
8) *C.-H. Tsai, J. Chen, J. W. Szostak,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *2007*, 104, *14598.*
9) *W. C. Winkler, R. R. Breaker,* Annu. Rev. Microbiol. *2005*, 59, *487.*
10) *B. Suess, B. Fink, C. Berens, R. Stentz, W. Hillen,* Nucleic Acids Res. *2004*, 32, *1610.*
11) *S. A. Lynch, S. K. Desai, H. K. Sajja, J. P. Gallivan,* Chem. Biol. *2007*, 14, *173.*
12) *S. Topp, J. P. Gallivan,* J. Am. Chem. Soc. *2007*, 129, *6807*
13) *W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker,* Nature *2004*, 428, *281.*
14) *L. Yen, J. Svendsen, J. S. Lee, J. T. Gray, M. Magnier, T. Baba, R. J. D'Amato, R. C. Mulligan,* Nature *2004*, 431, *471.*
15) *M. N. Win, C. D. Smolke,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *2007*, 104, *14283.*

➜

Andreas Marx, Jahrgang 1968, studierte Chemie an den Universitäten Freiburg, Sussex und Bochum. Er promovierte 1997 an der Universität Basel bei Bernd Giese. Von 1997 bis 1999 war er Postdoktorand an der Universität Nagoya bei Hisashi Yamamoto. 2003 habilitierte er sich an der Universität Bonn in organischer Chemie und Biochemie. Seit 2004 ist er Inhaber eines Lehrstuhl für Organische/Zelluläre Chemie an der Universität Konstanz. Sein Forschungsgebiet ist die chemische Biologie von Nucleinsäuren.

Jörg S. Hartig, Jahrgang 1974, studierte Chemie in Bonn und promovierte dort im Jahr 2003 in der Arbeitsgruppe von Michael Famulok. Nach zwei Jahren als Postdoktorand bei Eric T. Kool an der Stanford University, ist er seit 2006 Juniorprofessur an der Universität Konstanz im Rahmen des Lichtenberg-Programms der Volkswagen-Stiftung. Seine Forschungsinteressen: Beeinflussung von Struktur und Funktionen von Nucleinsäuren und anderen Biomakromolekülen sowie der Einsatz solcher Systeme in lebenden Zellen.