

Synthetische Biologie: Perspektiven

◆ Die Veröffentlichung des J. Craig Venter Institute, erstmals eine Bakterienzelle geschaffen zu haben, die durch ein chemisch synthetisiertes Genom gesteuert wird¹⁾ (Abbildung 1), erregte im vergangenen Jahr international viel Aufsehen. Wissenschaft, Politik, Medien und Öffentlichkeit diskutierten lebhaft, ob es sich hier um ein erstes Beispiel für von Menschen geschaffenes Leben handele. Darüber hinaus wurde der bereits zuvor begonnene Diskurs über Risiken und Chancen der synthetischen Biologie intensiviert.

Noch im Monat der Ankündigung der Venter-Publikation beauftragte der US-amerikanische Präsident seine Bioethik-Kommission, eine Studie zur synthetischen Biologie durchzuführen, deren Ergebnisse im Dezember 2010 vorgelegt wurden.²⁾ Hierzulande hatten schon im Juli 2009 die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG, die Deutsche Akademie der Technikwissenschaften acatech und die Deutsche Nationale Akademie der Wissenschaften Leopoldina eine gemeinsame Stellungnahme veröffentlicht.³⁾

Beide Studien bescheinigen der synthetischen Biologie großes Innovationspotenzial sowohl für die Grundlagenforschung, um ein besseres Verständnis über grundlegende Vorgänge in lebenden Zellen zu gewinnen, als auch für die industrielle Anwendung. Sie befürworten die Fortführung und Förderung dieser Forschungsrichtung unter begleitender Abschätzung und ggf. Eingrenzung möglicher Risiken.

Die Tages- und Online-Presse reagierte auf das chemisch synthetisierte Genom oft sehr effektheischend, die FAZ titelte am 21. Mai beispielsweise: „Synthetische Biologie: Die Angst vor dem Amok der Mikroben“. Allerdings war das von Gibson et al.¹⁾ beschriebene Ergebnis beileibe kein Schöpfungsakt von neuartigem Leben. Das von der Venter-Gruppe synthetisierte DNA-Molekül war nämlich eine nur leicht modifi-

zierte Kopie der durch Evolution entstanden Erbinformation eines natürlich vorkommenden Bakteriums. Auch die Zellhülle, in die das synthetisierte Genom eingebracht wurde, war die Hülle eines im Labor gezüchteten, aber in der Natur existierenden Bakteriums.

Was ist eigentlich synthetische Biologie?

◆ Synthetische Biologie ist gar nicht so neu, wie oft vermutet wird. Den Begriff und auch diese Teildisziplin der Biowissenschaften gab es bereits lange vor der Veröffentlichung der Venter-Gruppe.^{2,3,4)} Es fällt schwer, eine kurze, prägnante Definition für synthetische Biologie zu geben, denn viele Experimente, die man darunter subsumieren kann, werden schon lange durchgeführt. Auch die Übergänge zu Verfahren der Gentechnik, der Systembiologie und des Metabolic Engineering sind fließend. Deshalb bleiben generelle Beschreibungen der synthetischen Bio-

logie oft unscharf. Die auf der Internetseite <http://syntheticbiology.org> aufgeführte Beschreibung definiert sehr breit: „Synthetische Biologie ist a) das Design und der Aufbau neuer biologischer Bausteine und Systeme und b) der Nachbau existierender natürlicher biologischer Systeme für nützliche Zwecke. [Synthetic Biology is a) the design and construction of new biological parts, devices, and systems, and b) the re-design of existing, natural biological systems for useful purposes].“ Hilfreich ist es, die in der synthetischen Biologie verfolgten Strategien und Arbeitsmethoden zu betrachten, die sich in Top-down- und Bottom-up-Ansätze einteilen lassen (Abbildung 2).²⁾

Beim Top-down-Ansatz dienen existierende Organismen und ihre Gene als Basis. Diese werden mit molekularbiologischen Methoden reduziert (im Extremfall bis zum Minimalgenom,⁵⁾ das nur noch die lebensnotwendigen Gene enthält) und durch Ersatz von Genen oder Ergänzung neuer Gene so modifiziert,

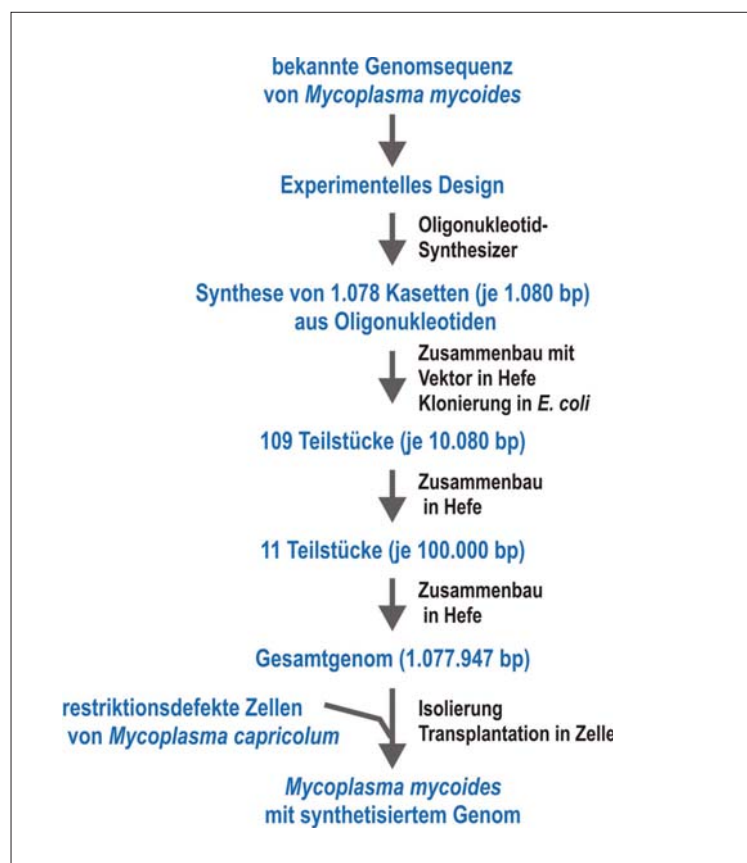


Abb. 1. Vorgehensweise bei Synthese und Transplantation des Genoms von *Mycoplasma mycoides* nach Gibson et al.¹⁾

Entwicklung von Produktionszellen ist aus Sicht der industriellen Anwendung nicht unattraktiv, aber sicherlich nicht kurzfristig zu erreichen. Realistischer ist da schon die wissensbasierte, schrittweise Optimierung (im Sinn einer Verbesserung von Produktionseigenschaften) von Genomen bereits eingesetzter Produktionsorganismen in iterativen Zyklen von genomischer Modifikation und Analyse der Stammeigenschaften.

Die Wissenschaft muss angesichts der Chancen der synthetischen Biologie an aktiver und sachlicher Informationsverbreitung in Politik und Öffentlichkeit interessiert sein. Sie muss den Eindruck vermeiden, die Wissenschaft versuche, in Frankenstein-Manier Leben, also womöglich unkontrollierbare Organismen, zu erschaffen. Mit Blick auf Risiken und Gefahren des Missbrauchs müssen Wissenschaftler und Wissenschaftsgemeinschaft ihre Verantwortung wahrnehmen und Maßnahmen zur Abschätzung und Regulierung von Gefahren ergreifen. Die Tatsache alleine, dass Risiken denkbar sind, darf jedoch nicht die Forschung lähmen. Die synthetische Biologie sollte im Kern als ein Erkenntnisinstrument verstanden werden, mit dem biologische Systeme (nach)gebaut und so besser verstanden werden können – ähnlich wie die synthetische Chemie für die Chemie.³⁸⁾

Wolfgang Liebl, Jahrgang 1959, ist Lehrstuhlinhaber für Mikrobiologie an der TU München. Er studierte Biologie mit Hauptfach Mikrobiologie und promovierte am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München. Nach einem Forschungsaufenthalt am MIT in Cambridge, Massachusetts, von 1986–1987 und der Habilitation an der TU München nahm er 1997 einen Ruf an die Universität Göttingen an und leitete dort die Abteilung für Genomische und Angewandte Mikrobiologie. 2008 wechselte er an die TU München. Seine Forschungsinteressen sind die angewandte Mikrobiologie, insbesondere Enzymatik des mikrobiellen Polysaccharidabbaus, extremophile Mikroorganismen und Physiologie und Genetik biotechnisch relevanter Bakterien. wliebl@wzw.tum.de



Literatur

- 1) 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. Hutchinson III, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* 2010, 329, 52.
- 2) The ethics of synthetic biology and emerging technologies [Hrsg.: A. Gutmann et al.] *Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues*, Washington DC, 2010. www.bioethics.gov
- 3) *Synthetische Biologie. Gemeinsame Stellungnahme von Deutscher Forschungsgemeinschaft DFG, Deutscher Akademie der Technikwissenschaften acatech und Deutscher Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina*, Juli 2009. www.acatech.de/fileadmin/user_upload/Baumstruktur_nach_Website/Acatech/root/de/Aktuelles_Presse/Dossiers/SynthBio_Endfassung_Internet.pdf
- 4) W. Szybalski, *In vivo and in vitro Initiation of Transcription*, 405. In *Control of Gene Expression*, 23–24 [Hrsg.: A. Kohn, A. Shatky], and *Discussion*, 404–405 (Szybalski's concept of Synthetic Biology), 411–412, 415–417. 1974, Plenum Press, New York.
- 5) L. Y. Zhang, S.H. Chang, J. Wang, *Protein Cell* 2010, 1, 427.
- 6) siehe <http://bbf.openwetware.org/>
- 7) B. R. Fritz, L. E. Timmerman, N. M. Daringer, J. N. Leonard, M. C. Jewett, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 232016.
- 8) J. Kirby, M. Nishimoto, J. G. Park, S. T. Withers, F. Nowroozi, D. Behrendt, E. J. Rutledge, J. L. Fortman, H. E. Johnson, J. V. Anderson, J. D. Keasling, *Phytochemistry* 2010, 71, 1466.
- 9) C. Hertweck, *Angew. Chem.* 2009, 121, 4782.
- 10) J. M. Crawford, C. A. Townsend, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 879.
- 11) W. Zhang, Y. Li, Y. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 20683.
- 12) Y. Katsuyama, Y. Hirose, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010, 74, 641.
- 13) Y. Katsuyama, Y. Hirose, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010, 74, 641.
- 14) M. Werneburg, B. Busch, J. He, M. E. Richter, L. Xiang, B. S. Moore, M. Roth, H.M. Dahse, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 10407.
- 15) J. M. Winter, S. Behnken, C. Hertweck, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.020.
- 16) Y. Li, W. Xu, Y. Tang, *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 22764.
- 17) C. Dellomonaco, F. Fava, R. Gonzales, *Microb. Cell Fact.* 2010, 9, 3.
- 18) L.R. Jarboe, X. Zhang, X. Wang, J. C. Moore, K. T. Shanmugam, L. O. Ingram, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 761042.
- 19) S. L. Tsai, G. Goyal, W. Chen, *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 7514.
- 20) S. J. Ha, J. M. Galazka, S. Rin Kim, J. H. Choi, X. Yang, J. H. Seo, N. Louise Glass, J. H. Cate, Y. S. Jin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 504.
- 21) A. Röttig, L. Wenning, D. Bröcker, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85, 1713.
- 22) Y. Elbahloul, A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 4560.
- 23) E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. Del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* 2010, 463, 559.
- 24) *Synthetic Genomics*, www.syntheticgenomics.com/media/emrefact.html; ExxonMobil: *Algae biofuels*, www.exxonmobil.com/Corporate/energy_climate_con_vehicle_algae.aspx
- 25) L. Fernández-Arrojo, M.E. Guazzaroni, N. López-Cortés, A. Beloqui, M. Ferrer, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 725.
- 26) H. L. Steele, K.-E. Jaeger, R. Daniel, W. R. Streit, *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 16, 25.
- 27) M. Ferrer, A. Beloqui, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 16, 109.
- 28) A. Angelov, M. Mientus, S. Liebl, W. Liebl, *Sys. Appl. Microbiol.* 2009, 32, 177.
- 29) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas III, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* 2008, 319, 1387.
- 30) J. D. Keasling, *Science* 2010, 330, 1355.
- 31) siehe www.genomik-transfer.de/index.php?section=verbund&fkz=0315586
- 32) R. Sorek, P. Cossart, *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11, 9.
- 33) J. M. Carothers, J.A. Goler, J. D. Keasling, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 20, 498.
- 34) J. M. Carothers, J. A. Goler, Y. Kapoor, L. Lara, J. D. Keasling, *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 2736.
- 35) J. M. Callura, D. J. Dwyer, F. J. Isaacs, C. R. Cantor, J. J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 15898.
- 36) A. E. Friedland, T. K. Lu, X. Wang, D. Shi, G. Church, J. J. Collins, *Science* 2009, 324, 1199.
- 37) N. Jagmann, H. P. Brachvogel, B. Philipp, *Environ. Microbiol.* 2010, 12, 1787.
- 38) M. Reth, *Forschung und Lehre* 2010, 8/10, 552.

dass die so erhaltenen, genetisch veränderten Organismen verbesserte oder neue genetische oder metabolische Eigenschaften aufweisen.

Der Bottom-up-Ansatz baut dagegen nicht auf existierenden, lebenden Zellen auf. Stattdessen sollen nicht lebendige Komponenten zu künstlichen biologischen Systemen zusammengesetzt werden. So werden Module mit bekannter Funktion neu kombiniert und es entstehen Systeme mit neuen Eigenschaften. Das Zusammenfügen derartiger Funktions- oder auch Regulationsmodule kann in Wirtsorganismen erfolgen oder künftig theoretisch auch in gänzlich künstlichen biologischen Systemen. Exemplarisch für diesen Ansatz initiierten Wissenschaftler des Massachusetts Institute of Technology (MIT), der Harvard University und der University of California (UCSF) einen offenen Katalog von biologischen Standard-DNA-Modulen (BioBrick standard biological parts), die für grundlegende biologische Funktionen kodieren und kombinier- und austauschbar sind.⁶⁾ Eine große Herausforderung

ist es zu lernen, wie man Basismodule derart miteinander verknüpft oder in bestehende biologische Systeme einpasst, dass sie sich wie vorhergesagt verhalten.⁷⁾

Die folgenden Beispiele und möglichen Anwendungen entstammen vor allem dem Bereich der Mikroorganismen. Hier ist, gerade was das Potenzial der synthetischen Biologie in absehbarer Zeit anbelangt, der größte experimentelle Fortschritt zu erwarten.

Genomtransplantation

◆ Zweifellos handelt es sich bei der Veröffentlichung des J. Craig Venter Institute¹⁾ um eine bis dato unvergleichliche Leistung der Molekularbiologie. Der wissenschaftliche Wert dieser Arbeit besteht vor allem darin, wesentliche technische Hürden überwunden zu haben. Erstmals ist es gelungen, ein komplettes bakterielles Genom von *Mycoplasma mycoides* (mit einer Gesamtlänge von etwa 1,08 Mbp übrigens ein vergleichsweise recht kleines Bakteriengenom) synthetisch nachzubauen.

Hierfür wurden fast 1100 jeweils 1080 bp große, überlappende DNA-Kassetten aus kleinen in vitro synthetisierten Oligonukleotiden zusammengesetzt und als etwa 10 kbp große DNA-Stücke in *Escherichia coli* kloniert. Diese Genomfragmente wurden dann in weiteren Schritten zunächst zu elf etwa 100 kbp großen Abschnitten und diese schließlich zum 1,08 Mbp großen, ringförmigen Gesamtgenom assembliert (Abbildung 1, S. 303).¹⁾

Der Trick dabei war es, lebenden Hefezellen den Zusammenbau der in sie transformierten Gemische überlappender DNA-Fragmente zu überlassen, denn die Assemblierung, aber auch die Vervielfältigung insbesondere der großen Genomteile war in vitro oder in *Escherichia coli* nicht möglich. Auch die Isolierung und die Handhabung von Genomstücken von 100 kbp oder 1 Mbp Größe war dabei experimentell zu bewältigen. Eine weitere beachtliche Leistung war es, das synthetisch hergestellte und in Hefe assemblierte Genom von *M. mycoides* erfolgreich in die Zellhülle einer anderen *Myco-*

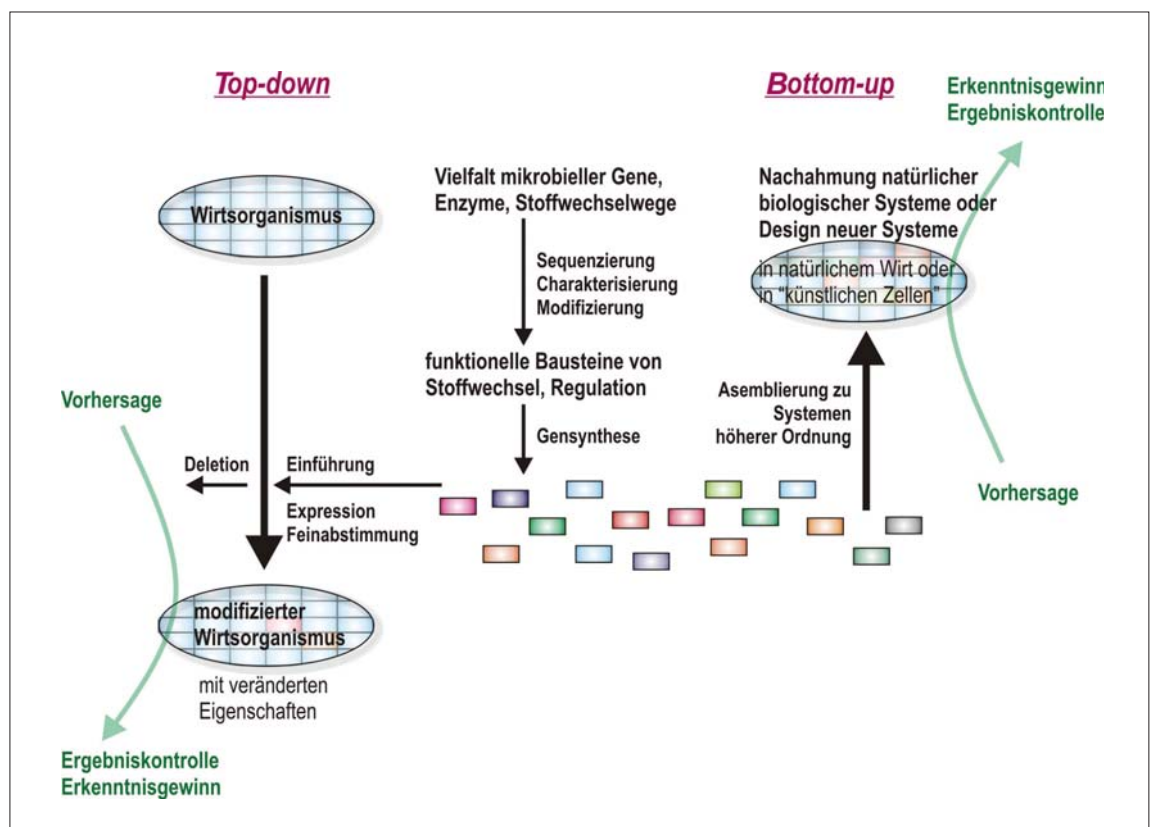


Abb. 2. Generelle Vorgehensweisen bei experimentellen Strategien der synthetischen Biologie.

plasma-Art, *M. capricolum*, zu transplantieren. Letztere sollte die eingeführte Fremd-DNA nicht zerstören und war deshalb restriktionsdefizient.

Es sei nochmals betont: Das eingeführte Genom wich nicht gravierend von der Genomsequenz eines natürlich vorkommenden, durch Evolution entstandenen Genoms ab. Damit war auch die durch die Genomtransplantation erhaltene Zelle genetisch oder physiologisch nicht grundlegend neu oder gar eine echte synthetische Zelle. Dieses Proof-of-principle-Experiment demonstriert jedoch, dass es technisch möglich ist, ein ganzes bakterielles Genom durch In-vitro-Synthese, Assemblierung und Transfer vollständig und funktional in eine artfremde Zellhülle einzuführen.

Synthese von hochwertigen chemischen Verbindungen

◆ Ein Anwendungsgebiet der synthetischen Biologie ist die Synthese chemischer Verbindungen in biologischen Wirten, die diese Verbindungen natürlicherweise nicht produzieren. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Casben, dem vermuteten Vorläufermolekül vieler Diterpene der Pflanzengruppe der Euphorbien, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Manche Diterpene aus Euphorbien sind medizinisch relevant oder mögliche Therapeutika, z. B. Prostratin, ein Aktivator von latentem HIV-1, oder Ingenol-3-angelat, ein Wirkstoffkandidat gegen Krebs. In einem eher ungerichteten Versuchsansatz identifizierten Kirby et al.⁸⁾ Diterpensynthasegene aus einer Auswahl von Euphorbien-Spezies und brachten diese Pflanzengene in einem modifizierten *S. cerevisiae*-Stamm zur Expression. In diesem Stamm war der Stoffwechselflux durch den Mevalonat-Weg erhöht, und dadurch häufte sich in der Zelle das Casben-Vorläufermolekül Geranylgeranyl-Diphosphat an. Die funktionelle Expression eines Pflanzen-Casbensynthasegens in diesem noch nicht optimierten System genügte, um Casben mit einer Konzen-

tration von 31 mgL^{-1} zu produzieren.

Ein anderes Beispiel ist das seit mehreren Jahren intensiv bearbeitete Gebiet der Biosynthese von natürlichen und nicht-natürlichen Polyketiden durch Polyketidsynthasen (PKS) [s. *Nachr. Chem.* 2011, 59, 29]. Durch ein immer tieferes Verständnis der Funktionsweise der einzelnen katalytischen Einheiten der PKS^{9,10)} erschließen sich zunehmend neue Möglichkeiten, Polyketid-Biosynthesewege zu verändern oder neu zu entwerfen (kombinatorische Biosynthese), um neue pharmazeutische Wirkstoffe zu gewinnen. Zhang et al. stellten beispielsweise mit *Escherichia coli* als heterologem Expressionssystem neue Polyketidstrukturen her.¹¹⁾ Weitere Beispiele für den Einsatz von Enzymen der Polyketidsynthese in künstlich zusammengesetzten Stoffwechselwegen in diesem heterologen Wirt, z. T. unter Fütterung mit Vorläufer substraten, sind die Produktion von unnatürlichen Flavonoiden und Curcumin-Analoga.^{12,13)} Werneburg et al. berichteten kürzlich über den Einsatz von Mutasynthese, Bio transformation und kombinatorischer Biosynthese für die Herstellung von 15 neuen Analoga von Aureothin, einem Shikimat-Polyketid-Hybridmetabolit mit antimikrobieller und Antitumorwirkung des Aktinomyceten *Streptomyces thiolatus*.¹⁴⁾

In Pilzen und Bakterien gibt es eine Vielfalt an putativen Genclustern für Sekundärmetabolitsynthese, die für PKS und nichtribosomale Peptidsynthetasen kodieren, von denen viele (zumindest unter den gewählten Kultivierungsbedingungen im Labor) nicht exprimiert werden.¹⁵⁾ Diese könnten dennoch künftig als natürlicher Fundus von Enzymbausteinen für die Neukombination von PKS-Funktionen zu neuen Synthesewegen dienen. Kürzlich beschrieben Li et al. einen Ansatz der vergleichenden Sequenzanalyse und phylogenetischen Klassifizierung von Produkttemplat(PT)-Domänen.¹⁶⁾ Polyketid-Cyclisierungsreaktionen von unbekannten PKS auf Grundlage de-

rer Sequenzen lassen sich so vorher-sagen, was für das Design neuer Polyketidsynthesewege hilfreich sein kann. Allerdings ist die funktionelle heterologe Expression von Genclustern für große, multimodulare Enzyme wie PKS nicht trivial.

Synthese von Bulk-Chemikalien: Biokraftstoffe

◆ Beispiele für in Entwicklung befindliche neue Verfahren, die Methoden der synthetischen Biologie nutzen, sind die fermentative Herstellung von Ethanol oder anderen Alkoholen aus Pflanzenzellwand-Polysacchariden, die Herstellung von Ethanol aus Glycerin oder die Produktion von Bio-Ölen mit modifizierten photosynthetischen Algen.^{17,18)}

Erhebliche Schwierigkeiten machen bei der Produktion von Bioalkoholen aus Lignocellulose die Unlöslichkeit und der ineffiziente Abbau des Pflanzenzellwand-Materials. Der Nachbau von bakteriellen Multienzymkomplexen des Celluloseabbaus (Cellulosomen) mit gentechnischen Methoden oder das Design neuer Komplexe¹⁹⁾ aus natürlich verfügbaren oder in vitro optimierten Enzymbausteinen ist eine Option zur Entwicklung effizienter Biokatalysatoren für den Lignocelluloseabbau dar. Ein weiteres Problem liegt darin, dass die üblicherweise für die Ethanolproduktion eingesetzten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die monomerisierten Zucker der Lignocellulose, ein Gemisch aus vor allem Glucose und Xylose, nicht effizient zu Ethanol vergären. Diese können entweder nur Glucose verwerten oder, im Fall von modifizierten Stämmen, die auch Xylose verwerten können, Xylose nur langsam und erst nach vollständigem Verbrauch der Glucose vergären. Vielfach wurde in der Vergangenheit bereits versucht, effizient Xylose vergärende Hefestämme zu entwickeln.¹⁷⁾ Kürzlich wurden metabolisch verbesserte Stämme mit einem hochaffinen Aufnahmesystem für Cellobiose konstruiert.²⁰⁾ Die Hydrolyse dieses Disaccharids aus

dem Celluloseabbau zu Glucose erfolgt dann intrazellulär durch eine β -Glucosidase. Der Effekt dieser Stamm-Modifizierung war, dass die Glucoserepression der Xyloseverwertung vermieden wurde und dass die neu entwickelten Stämme Xylose und Glucose simultan vergoren. Die Cofermentation von Cellobiose und Xylose steigerte die Ethanolausbeute.

Eine Alternative zu Alkoholen als Biokraftstoffen sind Fettsäurealkylester (Biodiesel) aus kurzkettigen Alkoholen und langkettigen Fettsäuren. Für die Herstellung gibt es chemische, enzymatische und fermentative Prozesse.²¹⁾ Da die heutige industrielle Biodieselproduktion hauptsächlich pflanzliche Öle und petrochemisch erzeugtes Methanol verwendet und meist bei Temperaturen von 60 bis 70 °C oder höher abläuft, wären effizientere enzymatische oder mikrobielle Verfahren attraktiv, insbesondere die vollständige Produktion von Fettsäurealkylestern aus einfachen und nachhaltig verfügbaren Kohlenstoffquellen durch dafür maßgeschneiderte Mikroorganismen. Kürzlich berichteten Elbahloul und Steinbüchel über die Bildung von etwa 25 % Fettsäureethylester in der Zelltrockenmasse von rekombinanten *E.-coli*-Zellen, die mit heterologen Genen für Enzyme der Bildung von Ethanol einerseits und der Fettsäureethylestersynthese andererseits ausgestattet worden waren.

Verbesserte *E.-coli*-Stämme beschrieben Steen et al.²²⁾ Neben den Fremdggen für die Ethanolproduktion (Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase) und die Acyltransferase waren diese so modifiziert, dass sie durch die Überexpression von Genen für Thioesterasen und Acyl-CoA-Ligasen und die Ausschaltung des Fettsäureabbaus durch gezielte Gendeletion einen erhöhten Spiegel an freien Fettsäuren aufwiesen. Zudem wurden *E.-coli*-Stämme generiert und für die Herstellung von Fettsäureethylestern eingesetzt, die Gene für Enzyme mit Xylanaseaktivität (Xyn10B aus *Clostridium stercorarium* und Xsa

aus *Bacteroides ovatus*) exprimierten und dadurch Biodiesel beim Wachstum auf der Hemicellulose Xylan produzierten.²³⁾

Eine Möglichkeit für die künftige Produktion von Bio-Ölen sind photosynthetische Algen. Algen nutzen als Energiequelle Sonnenlicht und sind wenig anspruchsvoll, was Wasserqualität und Medium anbelangt. Außerdem fixieren Algen durch ihre autotrophe Lebensweise Kohlendioxid. Die Biotech-Firma Synthetic Genomics modifizierte Algenstämme für die Produktion von Bio-Öl.²⁴⁾ Diese Algenstämme sind in einem kontinuierlichen Produktionsprozess einsetzbar.

Neue Funktionsmodule und mikrobielle Wirte

◆ Neue Funktionsmodule für die synthetische Biologie, beispielsweise neue Gene und Gencluster für neue Enzyme und ganze Stoffwechselwege, lassen sich aus der immensen Diversität der natürlichen Mikroorganismen gewinnen. Nach Schätzungen sind allerdings in manchen Proben mit komplexen Mikrobengemeinschaften über 99 % der darin enthaltenen Mikroorganismen mit heutigen Methoden nicht kultivierbar. Trotzdem lässt sich mit den erst seit wenigen Jahren verfügbaren Methoden zur Metagenomanalyse (Metagenom: Gesamtheit der Genome in einer Umweltprobe) deren genetisches und physiologisches Potenzial erschließen.^{25,26)}

Für das Aufspüren neuer Gene aus Metagenomen gibt es grundsätzlich zwei Vorgehensweisen: entweder sequenzbasiert oder funktionsbasiert. Beide Methoden isolieren zunächst Metagenom-DNA direkt aus Umweltproben oder aus Anreicherungskulturen. Anschließend werden Genbibliotheken in einem passenden Wirt-Vektorsystem angelegt.

Bei der sequenzbasierten Vorgehensweise folgt dann eine Hochdurchsatz-Sequenzierung, entweder völlig zufällig oder mit zuvor angereicherten DNA-Fragmenten. Die erhaltenen Sequenzdaten werden in si-

lico nach Genen für Proteine mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten Enzymen oder Enzymgenen durchsucht.

Bei der funktionellen Screening-Methodik dagegen sucht man mit einem möglichst spezifischen und sensitiven Aktivitätsassay in einer Metagenom-Bibliothek nach rekombinanten Klonen, die metagenomische Gene für eine gewünschte Funktion heterolog funktionell exprimieren. Der funktionsbasierte Ansatz ist also sequenzunabhängig und bietet damit den Vorteil, dass so auch neuartige Gene für eine bestimmte Funktion auffindbar sind, die keine Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Enzymen dieser Funktion aufweisen. Beispielsweise wurden so in den letzten Jahren Gene für neue Esterasen und Laccasen entdeckt, deren Primärstrukturen nicht verwandt waren mit bekannten Enzymen dieser Funktionen.²⁷⁾

Bei der Suche nach neuen Genen mit funktionsbasierten Screeningmethoden werden üblicherweise metagenomische Genbanken im Wirtsbakterium *Escherichia coli* hergestellt und durchmustert. Allerdings wird so nur ein Teil der für die gewünschte Funktion kodierenden Gene detektiert, denn bei weitem nicht alle metagenomischen Gene sind mit dem Genexpressionsapparat des klassischen Klonierungswirts *E. coli* kompatibel. Alternative Wirtsbakterien für das funktionelle Screening von (Meta)Genom-Genbibliotheken können mitunter die Ausbeute der gesuchten Gene erhöhen.²⁸⁾

Neben dem von der Natur vorgegebenen Enzymrepertoire lassen sich für das Design synthetischer Stoffwechselwege auch Enzyme gewinnen, deren katalytische Eigenschaften mit Methoden des strukturbasierten Designs oder molekularer Evolution verändert wurden. Auch Enzyme, die neue, in der Biologie bisher nicht bekannte Reaktionen katalysieren, sind so möglich. Jiang et al. etwa generierten durch In-silico-Design und experimentellen Nachweis Enzyme, die

eine Retro-Aldol-Reaktion zur Spaltung einer C-C-Bindung in dem (nicht in der Natur vorkommenden) Substrat 4-Hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthyl)-2-butanon katalysieren.

Wenn man mikrobielle Wirte für die industrielle Anwendung optimieren will, müssen sie unter anderem auch Eigenschaften aufweisen, die sie für die jeweiligen Prozessbedingungen (Substratverwertungsfähigkeiten, Stressresistenz usw.) tauglich machen.³⁰⁾ Derzeit nutzen die meisten Studien nur wenige mikrobielle Modellorganismen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oder *Saccharomyces cerevisiae*, denn für diese Organismen gibt es eine breite Datenbasis, und sie sind für genetische Modifikation gut zugänglich. Mit der Beschränkung auf wenige mikrobielle Wirtsorganismen nutzt man aber nur eine winzige Auswahl der natürlichen genetischen und physiologischen Vielfalt mikrobieller Zellen. Wirte unterscheiden sich in ihren grundlegenden physiologischen Eigenschaften (z.B. in ihrem Verhältnis zu Sauerstoff, externem pH-Wert und zur Temperatur oder in ihrem Energiestoffwechsel und ihrer Fähigkeit, verschiedene Substrate zu verwerten), aber auch in ihrer Zellwand- und Membranzusammensetzung, Phagenempfindlichkeit, Fähigkeit zur Expression heterologer Gene usw. Sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für die biotechnische Anwendung sind daher neue Wirtsorganismen wichtig. Der Forschungsverbund ExpressSys hat sich deshalb zur Aufgabe gestellt, neue Wirtsorganismen bereitzustellen.³¹⁾

Maßgeschneiderte Regulation

◆ Eine der vielleicht wichtigsten Erkenntnisse aus der Anwendung moderner Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren zur Analyse mikrobieller Transkriptome ist die zuvor unbekannte, enorme Komplexität nichtkodierender RNAs, von denen viele offenbar regulatorisch wirken.³²⁾ In vielen Ansätzen zur mikrobiellen Stammentwicklung, die

durch genetische Modifizierung Stämme und deren Stoffwechsel und Produktionseigenschaften verändern wollen, spielt die Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle. Die Verwendung von RNA in neu entwickelten Regulationssystemen erscheint hierfür attraktiv.^{33,34)}

Callura et al.³⁵⁾ beschrieben eine vielseitig einsetzbare, neue Methode, welche die Expression von Eigen- und Fremdgenen steuert. Diese könnten künftig eingesetzt werden, um z.B. Funktions- oder Regulationsmodule in mikrobiellen Zellen zu kontrollieren. Die Methode nutzt synthetische Riboregulatoren, die in Wirtszellen exprimiert und eingesetzt werden können, um durch RNA-RNA-Interaktion die Genexpression zu beeinflussen. So sind die dichte Regulation der Synthese von (auch toxischen) Proteinen, kurze Ansprechzeiten der Regulation, einstellbare Expressionsstärke von Genen oder die unabhängige Regulation mehrerer Gene möglich. Dieses RNA-basierte Regulationssystem wurde auch eingesetzt, um verschiedene Input-Signale in vivo zu verrechnen und damit ein gewolltes Regulationsereignis auszulösen, in diesem Fall einen programmierbaren Schalter zur Tötung der Bakterienzellen.^{35,36)}

Resümee

◆ Die aufgeführten Beispiele betreffen nur subzelluläre und Einzelzellansätze in der synthetischen Biologie. Aus Sicht der Mikrobiologie zählen jedoch auch komplexere Ansätze wie die Analyse von Physiologie und Interaktionen von zwei definierten Mikroorganismen, die im Labor kokultiviert werden,³⁷⁾ oder sogar die Analyse von künstlich zusammengestellten Ökosystemen zur synthetischen Biologie (synthetische Mikrobiologie).

Obwohl die heute verfügbaren, modernen Methoden der Molekularbiologie und Mikrobiologie Enzyme und ganze Stoffwechselwege gezielt modifizieren können, ist man von der Möglichkeit neue, syntheti-

sche Einzeller mit unnatürlichen Eigenschaften zu schaffen, sehr weit entfernt, erst recht von mehrzelligen eukaryontischen Organismen. Dafür weiß die Wissenschaft noch viel zu wenig über die komplexen regulatorischen Vorgänge sogar in vergleichsweise einfachen natürlichen Bakterienzellen.

Dennoch bleibt die Vision, maßgeschneiderte Produktionsorganismen für die Biotechnik zu gestalten, also Designerzellen für die Produktion von Designer-Chemikalien zu entwickeln.³⁰⁾ Hier sollte das Genom so umgestaltet sein,

- dass möglichst billige Substrate verwertet werden können,
- die Substratverwertung und Produktbildung optimiert sind und zum gewünschten Zeitpunkt stattfinden,
- dass sich keine unerwünschte Nebenprodukte bilden,
- die Produkttoxizität z.B. durch entsprechend eingestellte Cytoplasmamembran und Zellwand minimiert ist,
- die Zellphysiologie mit ihren Enzymen auf die gewünschten Prozessbedingungen (pH, Salzgehalt, Temperatur etc.) abgestimmt ist usw.

Ein derartiges Design auf dem Reißbrett von ganzen Genomen für die

