

Synthetische Biologie: Techniken

◆ Im Jahr 2010 gab es in der synthetischen Biologie die größten Fortschritte bei den synthetischen Genomen. Weiterhin wuchs das Verständnis bezüglich der Ökonomie natürlich vorkommender minimaler Genausstattungen sowie der Generierung von orthogonalen biologischen Systemen. Im Folgenden werden wir außerdem sowohl auf den experimentellen und konzeptuellen Fortschritt bei der künstlichen Genreduktion (Top-down-Strategie) und der damit verbundenen minimalen Zelle eingehen als auch auf die Anwendungen nichtkanonischer Monomere bei der (Bio)Synthese von natürlichen Polymeren – die Xenobiologie.

Top-down-Strategien und minimale Zellen

◆ Das Konzept der Genminimierung geht davon aus, dass sich durch Deletion verzichtbarer Chromosomenabschnitte einfachere Stämme erzeugen lassen. Diese benötigen einen geringeren Energieaufwand für ihre überlebenswichtigen Funktionen und sind somit effizienter in der Wertstoffproduktion einsetzbar. Allerdings herrscht noch keine Einigkeit darüber, wie weit die Minimierung gehen kann und soll, da es abhängig von den Umgebungsbedingungen unterschiedliche essenzielle Funktionen geben kann. Wahrscheinlich gibt es die minimale Zelle gar nicht. So ist bekannt, dass *Mycoplasma genitalium* eine Genomgröße von 580 kb mit 480 proteincodierenden Genen aufweist, während der Endosymbiont *Buchnera apidicola* bei einer Größe von 450 kb 400 proteincodierende Gene besitzt.¹⁾ Nach Koonin sollten aber 250 Gene ausreichen, um einer modernen Zelle das Überleben zu sichern.²⁾ Die weitere Minimierung der genetischen Ausstattung gibt vielleicht auch Aufschluss über die genetische Zusammensetzung des letzten gemeinsamen Vorfahren von Archaeen, Prokaryoten und Eukaryoten. Aller-

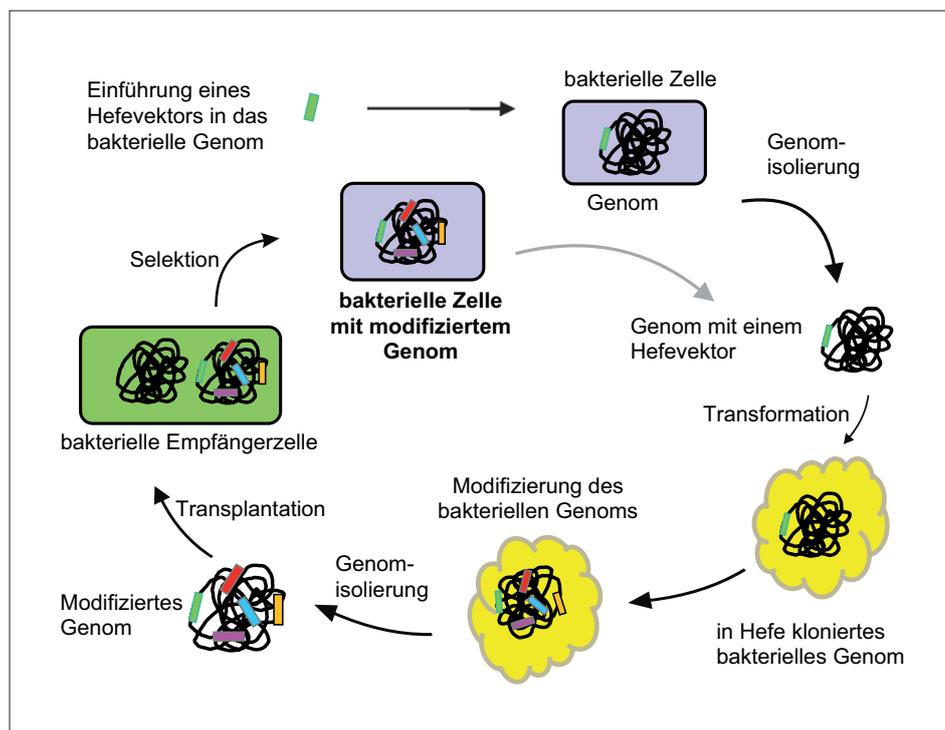


Abb. 1. Konzept der Klonierung bakterieller Genome.¹⁵⁾ Das Genom wird zunächst in Hefezellen eingebracht. Dies ermöglicht eine effiziente Modifizierung (z. B. das Einfügen von Insertionen, Deletionen, Neuarrangierungen usw.). Anschließend wird das modifizierte Genom wieder durch Genom-Transplantation in die Bakterienzelle überführt. Dieser Zyklus lässt sich mehrmals wiederholen.

dings ist bei all diesen Untersuchungen zu beachten, dass das Genom von unterschiedlichen Vertretern derselben Art sich erheblich unterscheiden kann. So fand das Team um Ussery beim Vergleich verschiedener *Escherichia-coli*-Stämme heraus, dass nur 20 Prozent des Genoms konserviert sind.³⁾

Um Minimalzellen zur Erkenntnis- und Produktgewinnung im Labor zu erzeugen, können zwei Strategien angewendet werden [siehe Kapitel „Synthetische Biologie: Perspektiven“]. So sollen beim Bottom-up-Ansatz die entsprechenden Zellen entworfen werden, indem die essenziellen Biopolymere in gereinigter Form mit allen nötigen Informationsträgern (Genen) und niedermolekularen Substraten innerhalb einer synthetischen Lipidhülle vereinigt werden. Das gegensätzliche Konzept ist der Top-down-Ansatz.⁴⁾ Bei beiden Ansätzen ist jeweils eine übergeordnete hierarchische Einheit nötig, die durchgängig stabil funktioniert. Allein für die Aufrechterhaltung der Funktionseinheit und ihrer eventuellen Reparatur sind

entsprechende Gene nötig. Eine Minimalzelle muss auf jeden Fall folgendes ermöglichen:

- Speicherung und Prozessierung von Information in Form von DNA (inkl. Replikation, Reparatur, Abbau und Modifizierung) und RNA (Transkription, Translation, Abbau etc.),
- Proteinprozessierung, -faltung und -sekretion,
- Aufnahmemechanismen für Substratmoleküle – da Minimalzellen einen Großteil ihrer Substrate und Metaboliten nicht selbst synthetisieren können, sind sie auf deren Aufnahme aus dem Medium angewiesen und dementsprechend müssen Zellstruktur, -wand und -prozesse darauf abgestimmt sein – und
- Elektronentransfer sowie der Transport von Protonen zur Erzeugung protonmotorischer Kraft (Energiemetabolismus).⁵⁾

In den letzten Jahren wurden die Genome von *E. coli* (4434 Gene) und *Bacillus subtilis* (4245 Gene) reduziert – teilweise auf 70 Prozent des Ursprungswerts.⁶⁻⁷⁾ Allerdings zeigen

die neusten Ergebnisse bezüglich *Mycoplasma pneumonia* (vermutlich 733 Gene), dass trotz geringer Genomgröße ein hoher Grad an Komplexität im Proteom und Metabolom erreicht wird.⁸⁻⁹⁾ Diese Beobachtungen bestätigen erneut, dass unser Wissen und Verständnis auch in Bezug auf natürliche Redundanzen begrenzt ist. Dies muss bei den experimentellen Arbeiten nach der Top-down-Strategie stets berücksichtigt werden. Andererseits lassen sich bereits jetzt wichtige Rückschlüsse ziehen: So würde im einfachsten Fall die Anwesenheit aller wichtigen Substrate und Metabolite im Kulturmedium die Deletion aller Gene ermöglichen, die ausschließlich metabolische Funktion haben. Die resultierende Minimalzelle wäre also nur mit Genen für die Kernfunktionen (Replikation der DNA, Synthese von RNA und Proteinen) ausgestattet. Interessanterweise ergab die Genomsequenzierung der Symbionten von *Carsonella ruddii* (213 Gene)¹⁰⁾ und *Hodgkinia cicadicola* (188 Gene),¹¹⁾ dass nur die Kernfunktionalitäten vorhanden sind und die Symbionten metabolisch sehr stark von den Wirtszellen abhängen.

Grundlegende Arbeiten aus dem Arbeitskreis Venter helfen dabei, alle gängigen Annahmen und Hypothesen im Gebiet der Minimalzelle zu

testen, da sie DNA-Synthesen und -Manipulationen in unbekanntem Maß erlauben. In einer Reihe von Experimenten aus den letzten drei Jahren gelang es, das 580 kb große Genom von *M. genitalium* durch Routinesynthese von Oligonukleotiden und späterer schrittweiser Verknüpfung in Hefe zu synthetisieren.¹²⁾ Außerdem wurde eine neue Assemblierungsmethode für In-vitro-Anwendungen entwickelt, die inzwischen nach dem Autor Gibson-Chemie benannt wurde. Eine beachtenswerte Weiterentwicklung war dann die Etablierung einer Methode zur Manipulierung und Klonierung ganzer Genome in Hefe. Mit dieser Technik wurde das 1,08 Mb große Genom von *M. mycoides* assembliert und von einer Zelle in eine andere transplantiert.¹³⁾

Diese Arbeiten erzeugten zwar noch keine künstliche Zelle, aber sie bedeuten einen enormen Fortschritt: Seit den 1970er Jahren war es möglich, einzelne Gene zu klonieren, heute können es nun ganze Genome sein.¹⁴⁾ Da Hefen sich besser genetisch manipulieren lassen als *Mycoplasma*, ist davon auszugehen, dass durch die Methode von Venter mehrere Mikroorganismen für die Forschung zugänglich werden, die sich sonst nur schwer kultivieren lassen.

Xenobiologie – CMOs statt GMOs

◆ Die meisten Forscher auf dem Gebiet der synthetischen Biologie konzentrieren sich auf natürliche Komponenten und versuchen, standardisierte biologische Einzelteile, Netzwerke und Subsysteme zu etablieren. Währenddessen wächst die Zahl derer, die an der Einführung von nichtnatürlichen (besser: nichtkanonischen) Molekülen in lebende Organismen arbeiten.

Die Chemie lebender Systeme ist hochgradig standardisiert: Der genetische Code übersetzt das vierbuchstabile Alphabet der DNA in die 20 Monomere der Proteinbiosynthese. Deshalb erfordert die Erzeugung eines tatsächlich künstlichen Lebens zusätzliche Codierungseinheiten, die sich in ihren chemischen und physikochemischen Eigenschaften von den natürlichen unterscheiden. Dies lässt sich nur durch neue Basenpaare realisieren, welche die Codierung zusätzlicher Aminosäuren möglich machen. Auf diese Weise wäre auch die Vermehrung der künstlichen Gensequenzen (und damit der künstlichen Proteine) möglich. Obwohl es bis dahin noch ein weiter Weg ist, tragen die langjährigen Anstrengungen Früchte. So konnten in den letzten Jahren eine Reihe von nichtkanoni-

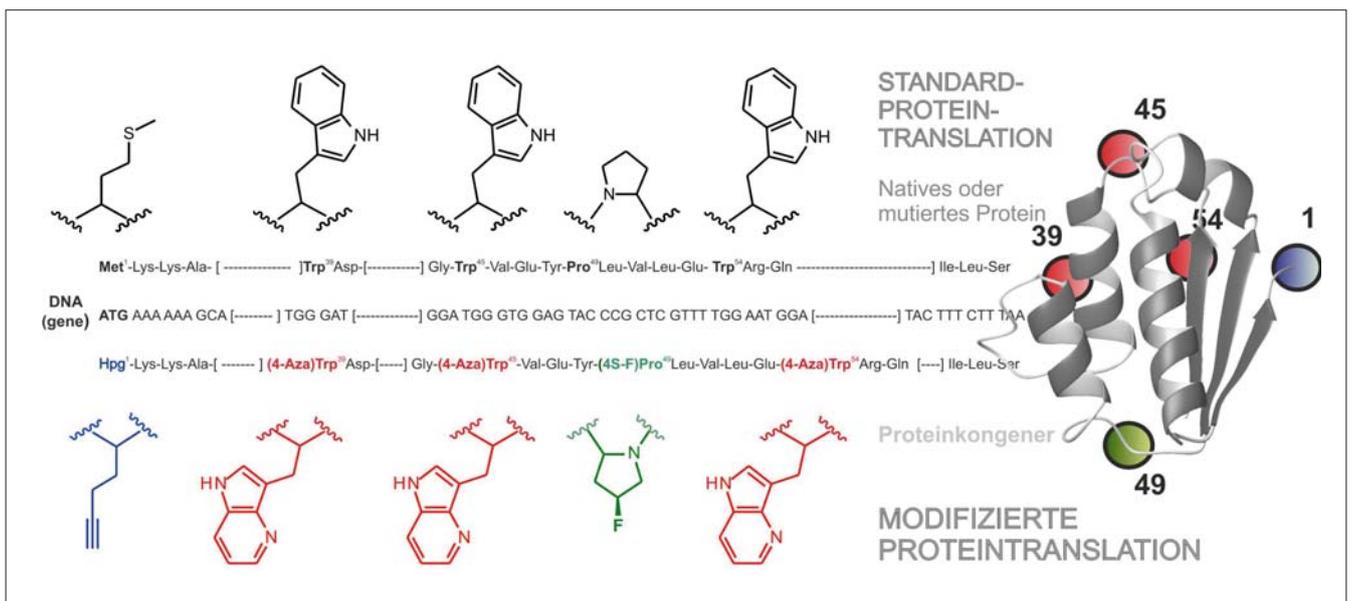


Abb. 2. Konzept des gleichzeitigen multiplen Einbaus nicht-kanonischer Aminosäuren. Mittels Genetic Code Engineering können in einem Protein global bestimmte Aminosäuren durch ihre synthetischen Analoga ersetzt werden. Dadurch wird eine chemische Funktionalisierung ermöglicht, die es so in der Natur nicht gibt. Die resultierenden Proteine werden Kongener genannt, da sie die gleiche Gensequenz wie das native Protein haben.

schen Monomeren für die Synthese von DNA und RNA eingesetzt werden, die nichtnatürliche Basenpaarungen erlauben.¹⁶⁾ Diese Xenonukleinsäuren sind somit Bestandteil der Xenobiologie.¹⁷⁾

Neben der höheren Biosicherheit ermöglicht die Xenobiologie einen Zugang zu einer ungekannten chemischen Diversität auf zellulärer Ebene.¹⁸⁾ Da diese Zellen nicht nur einen erweiterten genetischen Code haben werden, sondern die entsprechenden nichtnatürlichen Proteine eventuell auch andere Kofaktoren benötigen, um enzymatisch aktiv zu sein, kann man hier nicht mehr von genetisch modifizierten Organismen (GMOs) sprechen, sondern muss diese als chemisch modifizierte Organismen (CMOs) betrachten, die wirklich eine artifizielle vom Menschen erdachte Lebensform darstellen.

Zur Xenobiologie können auch die Proteinkongeneren gezählt werden, die sich mit nichtkanonischen Aminosäuren schon sehr zuverlässig erzeugen lassen (siehe unten). In letzter Konsequenz sind auch diese Kongeneren Vorstufen zu den beschriebenen CMOs. In diese Richtung gehen auch die Arbeiten von Wong, deren Anfänge in den 1980er Jahren liegen. Seiner Gruppe gelang es nun, *Bacillus-subtilis*-Stämme durch Zwangsfütterung und Selektion dazu zu bringen, verschiedene Tryptophan-Analoga proteomweit einzubauen. Die entsprechenden Trp-auxotrophen Stämme vermehren sich in Anwesenheit der nichtkanonischen Aminosäuren und sind nicht auf Tryptophan im Medium angewiesen.¹⁹⁾

Auf Arsen basierendes Leben – Fakt oder Fiktion?

◆ Ein sensationeller Artikel von Wolfe-Simons und Kollegen erschien letztes Jahr in *Science*. Darin beschreiben die Autoren die Entdeckung einer im kalifornischen Mono Lake lebenden Bakterienart (GFAJ-1), bei der Arsen statt Phosphor das Wachstum unterstützt.²⁰⁾ Zweifellos ist es von großem Interesse, in Zellen die Verwendung von

Arsen in Elektronentransferprozessen zu studieren oder die Mechanismen der Adaption aufgrund von umweltverschmutzenden Arsenrückständen in der Natur näher zu untersuchen. Allerdings stellen die Autoren die Hypothese auf, dass bei der gefundenen Art das Arsen Phosphor auch in lebenswichtigen Positionen substituiert, genauer gesagt im Rückgrat der Nukleinsäurepolymere. Obwohl die sterischen Verhältnisse solch ein analoges Verhalten vermuten lassen, ist bisher kein Beweis erbracht worden, dass ein arsenhaltiges ATP-Analog stabil sein würde.²¹⁾ Außerdem ist zu vermuten, dass ein arsenhaltiges Nukleinsäurerückgrat extrem hydrolyse- und oxidationsanfällig ist.²²⁾ Darüber hinaus liefern die Autoren keinen eindeutigen analytischen Beweis – z.B. durch massenspektrometrische Messungen – für die Existenz arsenhaltiger ATP- oder DNA/RNA-Moleküle im Zytoplasma von intakten *Halomonadaceae*-Zellen. Daher bleiben weitere experimentelle und analytische Bestätigungen, die angemessene Kontrollen enthalten, abzuwarten.

Allerdings werden hier auch die Grenzen von CMOs deutlich: Welche chemischen Funktionalitäten man auch immer in Zellen einbringen möchte, sie müssen den physiologischen Bedingungen auf der Erde entsprechen, also stabil in Wasser bei etwa 300K und neutralem pH-Wert sein. Dies schränkt die Möglichkeiten erheblich ein, artifizielle biologische Systeme zu etablieren.

Der genetische Code und seine Interpretationen

◆ Eine Möglichkeit, dem Ziel der Konstruktion einer künstlichen Zelle mit nichtnatürlichen Eigenschaften näher zu kommen, ist es, natürliche Substrate oder Monomere durch synthetische Analoga zu substituieren. Eine zweite ist die Einführung neuer Komponenten in lebende Zellen. Dabei nichtkanonische Aminosäuren, die sich von den 20 kanonischen unterscheiden, einzusetzen, ist einer der direktesten Wege. Seine

Anfänge liegen in den 1950er Jahren, aber erst seit den 1990ern wird dieser Ansatz ernsthaft verfolgt. Seinem langjährigen Nischendasein ist es geschuldet, dass derzeit Methoden aus dem Genomic Engineering, Metabolic Engineering, Cell Signaling und der erweiterten Systembiologie den biologischen Ansatz der synthetischen Biologie prägen. Allerdings besteht kein Zweifel, dass sowohl Genetic Code Engineering als auch Genetic Code Expansion zu zentralen Themen der synthetischen Biologie werden.

Beide Methoden verfolgen dasselbe Ziel und nutzen jeweils die Substrattoleranz verschiedener an der Translation beteiligter Komponenten, unterscheiden sich in der jeweiligen Vorgehensweise jedoch grundlegend. Während Genetic Code Engineering auf die Neuordnung von codierenden Basen-Triplets (Codons) setzt und in Folge dessen im Zielprotein während der Translation aminosäurespezifische Substitutionen erfolgen, werden bei der Genetic Code Expansion Stop-Codons neu interpretiert und auf diesem Wege zusätzliche Aminosäuren in den genetischen Code aufgenommen. Um aber im Zielprotein einen positionsspezifischen Austausch zu bekommen, sind mehrere



Optimierungsschritte zu durchlaufen (u. a. Evaluierung eines Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paares, Screening für die optimale Position des In-frame-Stop-Codons usw.).²³⁾ Obwohl beide Ansätze bisher größtenteils nur für den Einbau von nichtkanonischen Aminosäuren in einzelne Zielproteine verfolgt wurden, ist davon auszugehen, dass in Kombination mit den bereits erwähnten Arbeiten von Wong und Venter das Ziel der CMO-Herstellung näher rückt.

Bisher war in vivo durch Genetic Code Engineering nur eine synthetische Aminosäure pro Expressionsexperiment in ein Zielprotein einbaubar – das Kongener erhält somit eine neue Eigenschaft. Dies kann beispielsweise eine Änderung der biophysikalischen Eigenschaften wie Fluoreszenz oder Faltungsverhalten oder die Einführung einer neuen, bioorthogonalen funktionellen Gruppe sein, die es möglich macht, das Protein später chemisch zu modifizieren. Im letzten Jahr gelang es unserer Gruppe allerdings, in einem einzigen Experiment drei neue Aminosäuren in ein Zielprotein einzuführen.^{24–25)} Dadurch wurden in einem Fall ein neuer Chromophor, eine strukturstabilisierende Aminosäure sowie eine funktionalisierbare Gruppe in den Barnase-Inhibitor Barstar eingeführt, während im anderen Fall eine Lipase mit einer großen Zahl von Fluoratomen erzeugt wurde.

Etwa zur gleichen Zeit berichteten zwei weitere Gruppen über den parallelen Einbau von zwei Aminosäuren durch mutierte Tyrosyl-tRNA-Synthetase bzw. durch Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase. Liu und Kollegen nutzten dazu die Toleranz natürlicher Ribosomen, die zwei chemisch unterschiedliche synthetische Aminosäuren in das grünfluoreszierende Protein übersetzten. Die entsprechende mRNA wies zwei In-frame-Stop-Codons auf: UAG und UAA.²⁶⁾ Im Gegensatz dazu verwendete die Gruppe um Chin ein orthogonales Ribosom, das effizienter als das natürliche das Amber-Stop-Codon (UAG) sowie Quadruplett-

Codons überliest.²⁷⁾ Das modifizierte Protein war in diesem Fall Calmodulin. Beide Gruppen erbrachten den analytischen Nachweis des gleichzeitigen Einbaus zweier nichtkanonischer Aminosäuren sowie der Modifizierung der reaktiven funktionellen Gruppen (terminales Alkin bzw. Azid). Orthogonale Ribosomen bieten den Vorteil, dass aufgrund von Mutationen in der Shine-Dalgarno-Sequenz nur die modifizierte mRNA translatiert wird, während das Proteom weiter von nativen Ribosomen erzeugt wird.

Ein weiterer wichtiger Schritt war die Kombination von Genetic Code Engineering und Genetic Code Expansion in einem Experiment. Dadurch gelang es, ein mutiertes Proteinkongener zu erzeugen, bei dem einerseits ein positionsspezifischer Einbau einer nichtkanonischen Aminosäure erfolgte und gleichzeitig ein mehrfacher aminosäurespezifischer Einbau einer weiteren nichtkanonischen Aminosäure. Die Vorteile dieser Methode liegen auf der Hand: Durch den multiplen Einbau entstehen synergistische Effekte

(z. B. führt eine größere Zahl positiver Wechselwirkungen zu einer höheren Stabilität des Proteins), und die einzelne Aminosäure kann in Form eines Chromophors zur Detektion oder als orthogonaler reaktiver Reaktionspartner zur weiteren Modifikation dienen.²⁸⁾

Einen wichtigen Beitrag zur Genetic Code Expansion leistete auch die Gruppe um Skerra. Sie entwickelte eine neue Strategie zum Screening von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit hoher Spezifität für nichtkanonischen Aminosäuren.²⁹⁾ Der auf dem grünfluoreszierenden Protein basierende Ansatz kombiniert genetisches Screening mit FACS-Selektionsmethoden zu einer leistungsstarken Methode, die dem bisherigen auf Antibiotika basierenden Vorgehen überlegen ist.

Neue Entwicklungen im Bereich des multiplen Einbaus sowie kombinierte Methoden zur Inkorporation von nichtkanonischen Aminosäuren und bessere Screeningmethoden werden sicherlich in naher Zukunft zu anwendungsorientierten Kongeneren führen.

Nediljko Budisa ist seit Mai 2010 Leiter des Arbeitskreises Biokatalyse an der Technischen Universität Berlin. Er erhielt seinen Dokortitel 1997 in der Gruppe von Robert Huber am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Von 1997 bis 2010 war er am Max-Planck-Institut für Biochemie erst als Postdoktorand und dann als Privatdozent und unabhängiger Gruppenleiter tätig. Seine Forschung wurde unter anderem vom BioFuture-Programm des BMBF gefördert. Seine Forschung konzentriert sich auf den Kern der synthetischen Biologie und soll eine solide Basis für die Laborevolution synthetischer Lebensformen mit neuen chemischen Komponenten schaffen. nediljko.budisa@tu-berlin.de



Lars Merkel ist seit Mai 2010 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachgebiet Biokatalyse an der TU Berlin. Er studierte Chemie an der Technischen Universität Clausthal und fertigte im Jahr 2004 seine Diplomarbeit im Arbeitskreis von Andreas Schmidt in der organischen Chemie an. Für seine Doktorarbeit wechselte er in die Gruppe von Nediljko Budisa an das Max-Planck-Institut für Biochemie und die Technische Universität München, wo er 2008 promoviert wurde.



- 1) A. Mushegian, *Curr. Opin. Gen. Devel.* 1999, 9, 709.
- 2) E. V. Koonin, *Annu. Rev. of Genomics Hum. Genet.* 2000, 1, 99.
- 3) O. Lukjancenko, T. M. Wassenaar, D. W. Usery, *Microb. Ecol.* 2010, 60, 708.
- 4) M. C. Jewett, A. C. Forster, *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010, 21, 697.
- 5) R. Gil, F. J. Silva, J. Pereto, A. Moya, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68, 518.
- 6) G. Posfai, G. Plunkett, T. Feher, D. Frisch, G. M. Keil, K. Umenhoffer, V. Kolisnychenko, B. Stahl, S. S. Sharma, M. de Arruda, V. Burland, S. W. Harcum, F. R. Blattner, *Science* 2006, 312, 1044.
- 7) E. V. Koonin, Y. I. Wolf, *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11, 487.
- 8) E. Yus, T. Maier, K. Michalodimitrakis, V. van Noort, T. Yamada, W.-H. Chen, J. A. H. Wodke, M. Güell, S. Martinez, R. Bourgeois, S. Kühner, E. Raineri, I. Letunic, O. V. Kalinina, M. Rode, R. Herrmann, R. Gutiérrez-Gallego, R. B. Russell, A.-C. Gavin, P. Bork, L. Serrano, *Science* 2009, 326, 1263.
- 9) S. Kühner, V. van Noort, M. J. Betts, A. Leo-Macias, C. Batisse, M. Rode, T. Yamada, T. Maier, S. Bader, P. Beltran-Alvarez, D. Castaño-Diez, W.-H. Chen, D. Devos, M. Güell, T. Norambuena, I. Racke, V. Rybin, A. Schmidt, E. Yus, R. Aebbersold, R. Herrmann, B. Böttcher, A. S. Frangakis, R. B. Russell, L. Serrano, P. Bork, A.-C. Gavin, *Science* 2009, 326, 1235.

- 10) A. Nakabachi, A. Yamashita, H. Toh, H. Ishikawa, H. E. Dunbar, N. A. Moran, M. Hattori, *Science* 2006, 314, 267.
- 11) J. P. McCutcheon, B. R. McDonald, N. A. Moran, *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000565.
- 12) D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Badentillson, 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, H. O. Smith, *Science* 2008, 319, 1215.
- 13) 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, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* 2010, 329, 52.
- 14) G. A. Benders, V. N. Noskov, E. A. Denisova, C. Lartigue, D. G. Gibson, N. Assad-Garcia, R. Y. Chuang, W. Carrera, M. Moodie, M. A. Algire, Q. Phan, N. Alperovich, S. Vashee, C. Merryman, J. C. Venter, H. O. Smith, J. I. Glass, C. A. Hutchison, *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 2558.
- 15) C. Lartigue, S. Vashee, M. A. Algire, R.-Y. Chuang, G. A. Benders, L. Ma, V. N. Noskov, E. A. Denisova, D. G. Gibson, N. Assad-Garcia, N. Alperovich, D. W. Thomas, C. Merryman, C. A. Hutchison, H. O. Smith, J. C. Venter, J. I. Glass, *Science* 2009, 325, 1693.
- 16) A. T. Krueger, E. T. Kool, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11, 588.
- 17) M. Schmidt, *BioEssays* 2010, 32, 322.
- 18) P. Marliere, *Syst. Synth. Biol.* 2009, 3, 77.
- 19) W.-K. Mat, H. Xue, J. T.-F. Wong, *PLoS One*, 2010, 5, e12206.
- 20) F. Wolfe-Simon, J. S. Blum, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoefft, J. Pett-Ridge, J. F. Stolz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. W. Davies, A. D. Anbar, R. S. Oremland, *Science* 2010, doi: 10.1126/science.1197258.
- 21) S. R. Adams, M. J. Sparkes, H. B. F. Dixon, *Biochem. J.* 1984, 221, 829.
- 22) A. Danchin, *J. Cosmol.* 2010, 13, 3617.
- 23) N. Budisa, *Angew. Chem.* 2004, 116, 6586.
- 24) S. Lepthien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* 2010, 122, 5576.
- 25) L. Merkel, M. Schauer, G. Antranikian, N. Budisa, *ChemBioChem* 2010, 11, 1505.
- 26) W. Wan, Y. Huang, Z. Wang, W. K. Russell, P.-J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Angew. Chem.* 2010, 122, 3279.
- 27) H. Neumann, K. H. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* 2010, 464, 441.
- 28) M. G. Hoesl, N. Budisa, *ChemBioChem*, 2011, doi: 10.1002/cbic.201000586.
- 29) S. M. Kuhn, M. Rubini, M. Fuhrmann, I. Theobald, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* 2010, 404, 70.

Kombinatorische Biosynthese

Die zentrale Strategie für die kombinatorische Biosynthese ist die Rekombination oder sonstige Mutation von Enzymen, die an den Biosynthesen beteiligt sind (Abbildung 1). Hierüber werden einzelne Reaktionen in den Biosynthesekaskaden abgewandelt, weggelassen oder ersetzt, so dass ein alternatives Produkt am Ende der Biosynthese steht.

Das Konzept wurde aufgrund seines Potenzials viel beachtet, und eine Reihe von Arbeitskreisen beschäftigt sich damit. Dabei zeigten sich allerdings gravierende Schwierigkeiten, so dass dieses Forschungsgebiet noch am Anfang seiner Entwicklung ist.

Die größte konzeptionelle Herausforderung für die kombinatorische Biosynthese ist die Identifikation grundlegender Regeln, um Biosynthesewege umzuprogrammieren. Eine wesentliche Hürde ist, die Interaktionen zwischen den verschiedenen Enzymen untereinander und mit ihren jeweiligen Substraten zu verstehen. Außerdem ist die kombinatorische Biosynthese gegenwärtig oft durch fehlende organisch-chemische und biochemische Methoden begrenzt. In den vergangenen Jahren erschien jedoch eine Reihe von Arbeiten, die das große Potenzial und die Vielseitigkeit dieser Strategie zeigen.

Allen Anstrengungen zur kombinatorischen Biosynthese jedweder Substanzklasse gemeinsam sind die Voraussetzungen, die vor jedem Experiment erfüllt sein müssen: Die be-

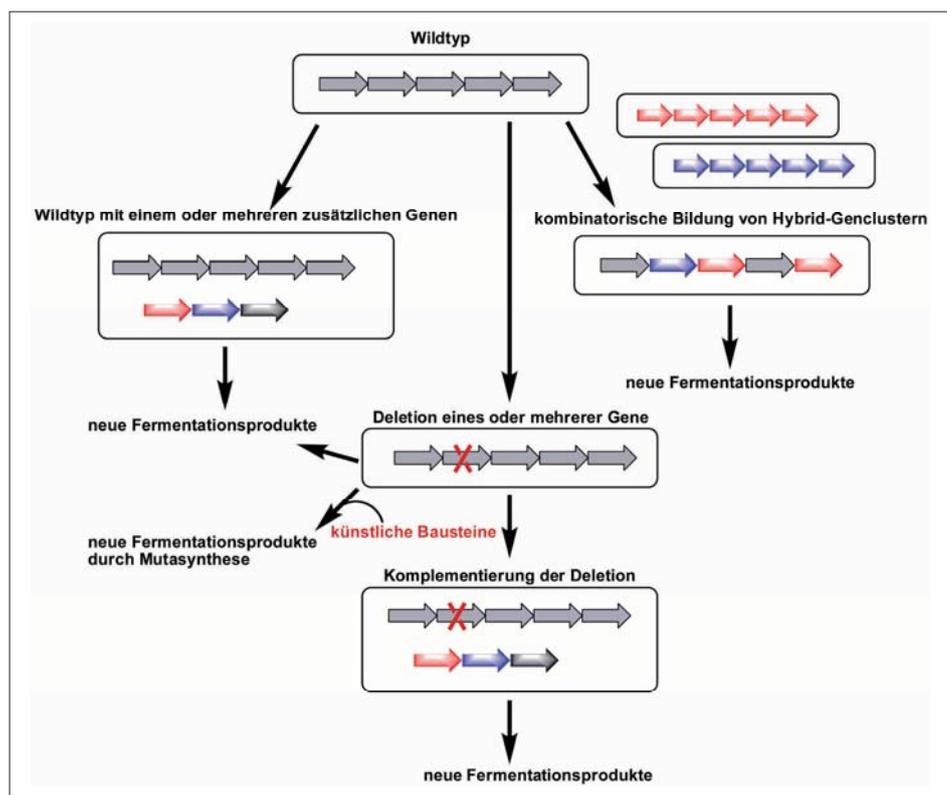


Abb. 1. Strategien in der kombinatorischen Biosynthese: Ein natürlich vorkommender biosynthetischer Gencluster kann mit zusätzlichen Genen versehen werden, die der Biosynthese einzelne Syntheseschritte hinzufügen. Daraus resultieren neue Fermentationsprodukte. Aus einem Gencluster können jedoch auch Fragmente entfernt oder inaktiviert werden. Diese Lücke in der Biosynthese kann anschließend mit alternativen Genen komplementiert werden. Ein Spezialfall dieser Variante ist die Mutagenese, bei der gezielt Gene ausgeschaltet werden, welche die Herstellung eines definierten Biosynthesebausteins dirigieren. Der dadurch entstehende Mangel lässt sich dann durch Zugabe synthetischer Bausteine komplementieren, auch der Einbau nichtnatürlicher funktioneller Gruppen ist möglich. Mit oder ohne Komplementierung kann auch diese Strategie Naturstoffderivate liefern. Experimentell außerordentlich anspruchsvoll ist die dritte Variante der kombinatorischen Biosynthese, in der gleich mehrere Gencluster durch molekularbiologische Methoden rekombiniert werden. Dadurch entstehen stark vom Ausgangszustand verschiedene Gencluster.