

Daniel Frank¹

VOM HANDWERKSZEUG DER GENTECHNIK UND DER SYNTHETISCHEN BIOLOGIE

Was machen eigentlich Forscher der Synthetischen Biologie? Will man diese Frage beantworten, so kann man dies auf zweierlei Weisen angehen. Mit der Charakterisierung der Synthetischen Biologie als herstellende Disziplin wirft sie zum einen die Frage auf, was unter der Herstellung von „Leben“ genau verstanden werden kann und wie die erzeugten Produkte theoretisch eingeordnet werden können. Zum anderen liegt die Frage auf der Hand, mit welchen Methoden und Technologien in dieser neuen Forschungsrichtung gearbeitet wird. Was tun Forscher, um lebende Systeme herzustellen? Wie unterscheidet sich dies von bisheriger biotechnologischer Forschung? Diesem zweiten Fragenkomplex nach den konkreten Methoden der Synthetischen Biologie widmet sich der vorliegende Beitrag. Auf diesem Weg lässt sich zwar nicht (genau) bestimmen, was die Synthetische Biologie ist, doch darf dieser Aspekt für den Versuch einer solchen Bestimmung nicht außer Acht gelassen werden. Gerade anhand der verwendeten Methoden lässt sich zeigen, dass die Synthetische Biologie keine völlig neue Disziplin ist, sondern sich allmählich aus der herkömmlichen Gentechnik und Biotechnologie herausentwickelt hat oder – zumindest in bestimmter Hinsicht – diesen zuzurechnen ist. Um das Handwerk der Synthetischen Biologie zu verstehen, werden im Folgenden einige wichtige Methoden von den Anfängen der Gentechnik bis zur Synthetischen Biologie in gebotener Kürze dargestellt. Es sei hier darauf verwiesen, dass die beschriebenen Methoden nur eine Auswahl darstellen und auch für verschiedene Zwecke in unterschiedlichen Varianten und Kombinationen genutzt werden. Ferner stellen die hier vorgestellten Methoden nur denjenigen Teil der Synthetischen Biologie vor, der an der physischen „Synthese“ bzw. Modifikation beteiligt ist. Bevor diese im Labor Anwendung finden, kommen in der Synthetischen Biologie computergestützte Designverfahren zum Einsatz, die den Status der Synthetischen Biologie als interdisziplinäres Forschungsfeld stark mitbegründen (Way et al. 2014; König et al. 2013). Diese werden hier jedoch nicht weiter thematisiert.

1 Zitationsvorschlag: Frank, Daniel (2014): Vom Handwerkszeug der Gentechnik und der Synthetischen Biologie, in: TTN edition. 1/2015, 8–28, online unter: www.ttn-institut.de/TTNedition [Datum des Online-Zugriffs].

Für die Einordnung der anderen Artikel dieses Bandes, die sich mit der Synthetischen Biologie befassen, ist es sicherlich hilfreich, wenn dieses oft als neu propagierte Forschungsfeld der Synthetischen Biologie zunächst in einen historisch-methodischen Kontext gestellt wird. Dieser einführende Beitrag soll Lesern, die mit den Methoden der Gentechnik und der Synthetischen Biologie nicht vertraut sind, eine Orientierung bieten, indem einige bedeutende Stationen auf dem Weg von der Gentechnik zur Synthetischen Biologie in gebotener Kürze dargestellt werden.

Die klassische Genetik, die um die Wende vom 19. zum 20. Jahrhundert entstand, nahm ihren Ausgangspunkt bei der Erscheinung, d. h. den Merkmalen eines Organismus – dem Phänotyp – und suchte dann nach den erblichen Anlagen – den Genen –, die diese Merkmale hervorbringen. Ursprünglich wurden Gene also als Faktoren gedacht, die phänotypische Eigenschaften bestimmen. Infolge der Entdeckung der molekularen Mechanismen der Vererbung und der Entwicklungsbiologie kam es zu einer signifikanten Verschiebung: Gene wurden nun als DNA-Abschnitte begriffen.² Viele Genome (d. h. die Gesamtheit aller Gene in einer Zelle bzw. in einem Organismus) sind mittlerweile in der Sequenz ihrer Basenabfolge bekannt und zahlreiche Gene in ihrer Funktion aufgeklärt. In Folge der Entdeckung des genetischen Codes und des aufkommenden Informationsparadigmas in der Biologie, das sich verbunden mit deren Molekularisierung in der Mitte des 20. Jahrhunderts zu etablieren begann, war der Wissenschaftler zunächst als „Theoretiker nur so etwas wie ein Mitleser, der dem Mechanismus von Ablesung und Asteilung der Information über die Schulter sieht“ (Blumenberg 1981, S. 399). Doch längst ist er dazu übergegangen, zum Autor zu werden. Während die „klassische“ Gentechnik nach dieser Metapher noch damit befasst ist, die vorhandenen Texte umzuschreiben und zu redigieren, so geht die Synthetische Biologie einen Schritt weiter: Sie hat es sich zum Ziel gesetzt, gänzlich neue Texte zu verfassen.

Der Wissenschaftshistoriker Hans-Jörg Rheinberger weist darauf hin, dass zwar schon mit der „neuen Biologie“ ab den späten 1930er Jahren der Organismus den „Status eines technischen Objekts“ angenommen hatte, aber

„erst mit der Möglichkeit, das genetische Reproduktionsprogramm der Zelle mit Hilfe ihrer eigenen – modifizierten und unmodifizierten – Komponenten zu bearbeiten, verlässt der Molekularbiologe – als Gentechnologe – das Arbeitsparadigma des klassischen Biophysikers, Biochemikers und Genetikers. Er konstruiert nicht länger Reagenzglas-Bedingungen, unter denen die Moleküle des Organismus und ihre Reaktionsfolgen den Status wissenschaftlicher Objekte annehmen. Genau andersherum: Der Molekulartechnologe konstruiert informationstragende Moleküle, die nicht länger bereits im Organismus existieren müssen, und um sie zu reproduzieren, zu exprimieren und zu analysieren, benutzt er das Milieu der Zelle als deren angemessene technische Einbettung. Der Organismus selbst wird damit in ein Labor verwandelt. Worum es von nun an geht, ist nicht länger die extrazelluläre Repräsentation intrazellulärer Strukturen und Prozesse, sondern die intrazelluläre Repräsentation eines extrazellulären Projekts, mit einem Wort: die Um-Schreibung des Lebens. Das zeichnet, aus einer epistemischen Perspektive, die Gentechnologie aus“ (Rheinberger 2000, S. 661–662).

2 Was als Gen zu verstehen ist, ist bis heute hoch umstritten (vgl. Beurton 2005). Dennoch herrscht wohl weitgehend Einigkeit darüber, dass jedem Gen ein entsprechender Abschnitt aus dem Erbmaterial, der DNA, zuzuordnen ist, selbst wenn dieser nicht als das Gen selbst zu bezeichnen ist.

Wann nun ein Text soweit verändert wurde, dass es sich dabei um einen neuen Text handelt, d.h. wann aus dem Verändern von Organismen ein Herstellen neuer Organismen geworden ist, lässt sich nicht eindeutig bestimmen. Der Übergang vom Umschreiben zum Neuschreiben ist fließend, es lassen sich aber Meilensteine benennen.

Dabei konzentrieren sich alle im Folgenden vorgestellten Methoden auf die DNA. In der Biologie wird heute allgemein davon ausgegangen, dass Gene den „Bauplan“ für den herzustellenden Organismus enthalten. Dabei muss immer gegenwärtig sein, dass Gene die Information enthalten, die die Herstellung von Proteinen und von sogenannten nichtkodierenden RNA-Molekülen (d.h. RNA-Moleküle, die nicht als Botenmoleküle zur Proteinherstellung dienen) ermöglicht. Beide haben wichtige Funktionen in Zellen. Proteine sind für alle organischen Prozesse von nicht überschätzbarer Bedeutung. Sie katalysieren als Enzyme unzählige biochemische Reaktionen (einschließlich der Replikation und der Expression von Genen), als Transporter ermöglichen sie in Membranen die Kommunikation zwischen Zellen, als Hormone regulieren sie Körperprozesse und als Strukturproteine geben sie Zellen und Geweben Festigkeit und ihre Form. Auch nicht-kodierende RNA-Moleküle vermitteln wichtige enzymatische Prozesse, dienen als molekulare Sensoren und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Die Werkzeuge, derer sich die Gentechnik bedient, sind zumeist selbst Proteine. Proteine sind jedoch nicht in der Lage, sich selbst zu kopieren, wie es die DNA (mit Hilfe von entsprechenden Proteinen bzw. Enzymen) kann, und müssen in der Proteinbiosynthese nach Vorlage der DNA von den Zellen hergestellt werden. Die DNA kodiert dabei letztlich die Reihenfolge, in der die Aminosäuren zu Ketten zusammengefügt werden, aus denen Proteine bestehen (vgl. Abbildung 1). Diese Aminosäureketten falten sich dann nach bestimmten Gesetzmäßigkeiten und nehmen dadurch ihre funktionale Struktur an. Will man nun bestimmte Proteine durch eine Zelle herstellen lassen, setzt man am Anfang dieses Prozesses der Proteinbiosynthese an. Letztendlich zielen die Bestrebungen der Gentechnik meist darauf ab, die DNA eines Organismus so umzugestalten, dass dieser Proteine herstellt, die er zuvor nicht herstellen konnte. Hierfür müssen die entsprechenden Gene in Form von DNA-Abschnitten, die für ein Protein kodieren, in den Organismus eingebracht werden, um dann diese Proteine über die Proteinbiosynthese herstellen zu können.

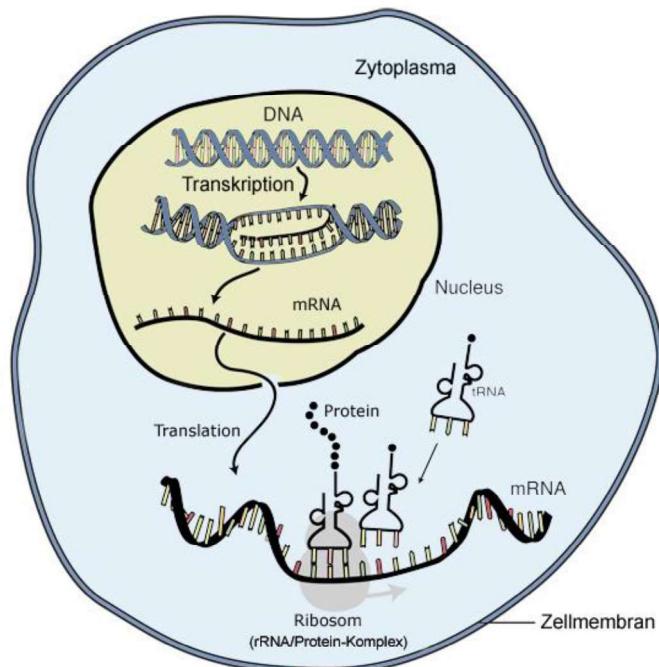


Abbildung 1) Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese bei Eukaryoten. Der DNA-Doppelstrang im Zellkern wird geöffnet und in die messengerRNA (mRNA) transkribiert. Diese kodiert in Basentriplets für bestimmte Aminosäuren, die im Zytoplasma von der transferRNA (tRNA) an die entsprechenden Stellen transportiert werden. Ribosomen verbinden die Aminosäuren zu Polypeptiden, die sich dann ggf. zu Proteinen falten. (http://de.wikipedia.org/wiki/Proteinbiosynthese#mediaviewer/File:Transkription_Translation_0_1.jpg [23.03.15])

Das Grundprinzip der Gentechnik

Das Einbringen eines Gens in einen Organismus einer anderen Spezies war wohl einer der bedeutendsten Schritte auf dem Weg zur Synthetischen Biologie. Zum Verständnis des Prinzips, das biotechnologisch genutzt wird, um ein Gen in einen Organismus einzubringen, ist es unumgänglich, den Mechanismus der Rekombination zu verstehen. Denn dieser Mechanismus ist es, den sich gentechnische Methoden und auch die Synthetische Biologie zu Nutze machen. Als Rekombination bezeichnet man zunächst einen natürlichen Mechanismus, bei dem es zu einer Neuanordnung von genetischem Material kommt – etwa zwischen sich entsprechenden (= homologen) Chromosomen (vgl. Abbildung 2). Dies geschieht beispielsweise bei der Bildung der Keimzellen durch die Meiose, wobei neue Allelkombinationen³ ermöglicht werden. Dabei ereignet sich ein Austausch von homologen chromosomalen Abschnitten zwischen väterlichen und mütterlichen homologen Chromosomen, d. h. denjenigen Chromosomen, die die gleichen Gene enthalten. Hierbei dient die homologe Rekombination dazu, genetische Variabilität zu erzeugen. Von somatischen Zellen wird der Mechanismus der homologen Rekombination aber auch genutzt, um Schädigungen der DNA zu reparieren – beispielsweise wenn es zu Doppelstrangbrüchen kommt oder wenn Schwierigkeiten bei der Replikation auftreten. Dabei zeigt sich der Vorteil eines doppelten Chromosomensatzes. Denn die intakte DNA

3 Als Allel bezeichnet man Zustandsformen bzw. Varianten eines Gens.

des einen Chromosoms wird als Vorlage für die Reparatur des geschädigten Chromosoms genutzt.

Eine solche homologe Rekombination kann aber nicht nur dann stattfinden, wenn sich die entsprechenden Regionen homologer Chromosomen finden, wie dies bei der DNA-Reparatur und der Meiose der Fall ist. Sie kann auch dann stattfinden, wenn von außen ein DNA-Fragment eingebracht wird, das homolog, d.h. hinreichend ähnlich zur oder identisch mit der gewünschten Zielsequenz ist. Diesen Umstand macht sich die Gentechnik zunutze. Denn während bei den natürlichen Reparaturmechanismen der DNA über homologe Rekombination endogene Templates (d.h. Vorlagen in Form des homologen Chromosoms) genutzt werden, können auch von außen exogene Templates zur Verfügung gestellt werden. In diesem Fall wird also nicht ein eigenes, ähnliches Chromosom als Vorlage benutzt, sondern ein ähnlicher, von außen eingebrachter DNA-Abschnitt. Allerdings tritt die homologe Rekombination auch dann nur äußerst selten ein, sodass eine geplante Integration nur in wenigen Zellen gelingt und viele Versuche nötig sind.

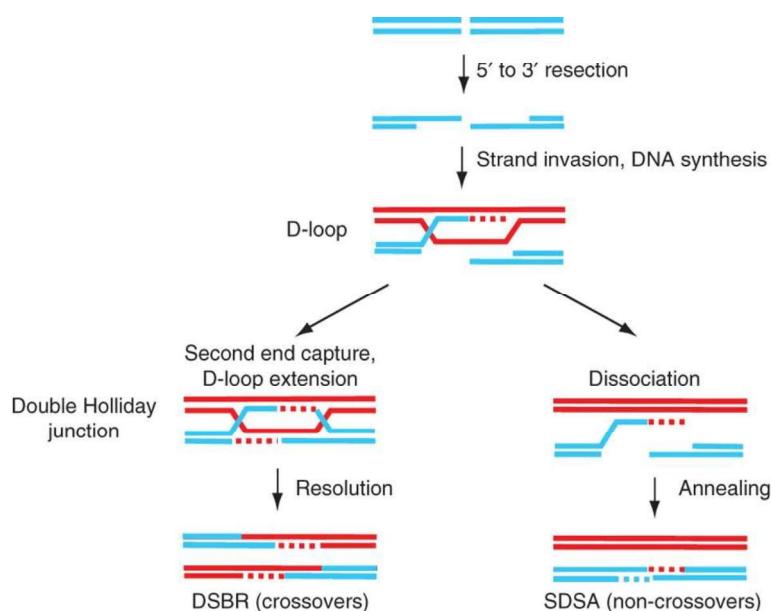


Abbildung 2) Erfolgt ein Doppelstrangbruch (DSB), so werden zunächst die 5'-OH Enden enzymatisch abgebaut, um je ein freies 3'-OH Ende zu erzeugen. Ein freies 3'-OH Ende dringt in den benachbarten, homologen Duplex ein und bindet an diesen (Bildung eines D-loop). Nun gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder es bildet sich eine sogenannte „holiday junction“, deren Auflösung zum „Double Strand Brake Repair“ (DSBR), d.h. zum „crossing over“ führen kann (links). Oder die D-loop-Struktur löst sich wieder auf, wobei es durch den Mechanismus des „Synthesis-Dependent Strand Annealing“ (SDSA) zwar zur Rekombination zwischen den Chromosomen kommt, nicht jedoch zum „crossing over“. Weitere Varianten der homologen Rekombination sind hier nicht dargestellt.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Structural & Molecular Biology* (Bugreev et al. 2011), copyright (2011).

Restriktionsendonukleasen – Die Anfänge der Gentechnik

Doch um ein Gen eines Organismus in einen anderen Organismus einbringen zu können, muss dieses erst einmal als DNA-Strang zur Verfügung stehen. Zu Beginn der Gentechnik handelte es sich bei den DNA-Abschnitten, die in einen Organismus eingebracht werden sollten, nicht um designte, synthetische DNA-Abschnitte bzw. Gene. Vielmehr wurde zunächst versucht, Gene von einem (natürlichen) Organismus in einen anderen zu transferieren und auf diese Weise sogenannte transgene Organismen herzustellen.

Für die Isolierung eines Gens in Form eines DNA-Abschnitts aus einem Organismus war die Entdeckung der Restriktionsenzyme oder Restriktionsendonukleasen von großer Bedeutung. Denn mit deren Entdeckung 1967 gelang es erstmals, DNA – mehr oder weniger gezielt – in mehrere Abschnitte zu zerteilen. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA schneiden können, indem sie die Phosphodiester-Bindung eines DNA-Strangs aufspalten. Diese Restriktionsenzyme schneiden DNA nicht beliebig, sondern besitzen eine Erkennungssequenz, mit der sie spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen binden und dort schneiden. Ursprünglich stammen diese Enzyme aus einer Art bakterielllem „Immunsystem“⁴. Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen. Sie schleusen ihre DNA in diese ein und nutzen den zellulären Apparat des Wirtsbakteriums, um sich zu vermehren. Bakterien können dank der Restriktionsenzyme jedoch die fremde DNA der Bakteriophagen zerschneiden, um so den viralen Angriff abzuwehren. Die DNA des Bakteriums selbst besitzt hingegen bestimmte Markierungen (Methylierungen), die verhindern, dass die eigene DNA geschnitten wird. Wie dieses und die folgenden Beispiele zeigen, sind die Werkzeuge, mit denen biotechnologisch gearbeitet wird, ihrerseits zu meist selbst organischen Ursprungs und aus Biomolekülen aufgebaut.⁵

Wenige Jahre nach der Entdeckung der Restriktionsenzyme gelang eine weitere bahnbrechende Entdeckung, die ebenfalls mit dem Nobelpreis ausgezeichnet werden sollte. Nachdem es durch Restriktionsenzyme möglich geworden war, DNA bis zu einem gewissen Grad selektiv zu schneiden, bestand der nächste Schritt darin, diese erhaltenen Fragmente neu zu kombinieren, d. h. zu rekombinieren. Die erste rekombinante DNA (rDNA) stellte Paul Berg bereits 1972 her, indem er die DNA zweier unterschiedlicher Viren (SV40 Virus und λ -Bakteriophage) mit dem gleichen Restriktionsenzym (EcoRI) schnitt. Da die unterschiedlichen Stücke damit über die gleichen (komplementären) Enden verfügten, ließen sie sich durch enzymatisch gesteuerte Reaktionen wieder so zusammensetzen, dass eine hybride DNA entstand. Dieses Experiment führte zu heftigen Diskussionen über die Gefahren solcher Experimente. Paul Berg selbst war daraufhin auch Initiator der Asilomar Konferenz, die mit einem vorübergehend selbstaufgeriegten Moratorium endete und die Technik rekombinanter DNA unter strenge Auflagen stellte, welche von den National Institutes of Health (NIH) in den USA und vergleichbaren Einrichtungen in anderen Ländern übernommen wurden.

Nach dem Schneiden durch Restriktionsenzyme und der Rekombination dieser Elemente im Reagenzglas (*in vitro*) sollte bald der nächste Schritt folgen, vor dem Berg noch

4 Bakterien verfügen über kein Immunsystem im eigentlichen Sinne. Es handelt sich aber dennoch um einen Schutzmechanismus vor viralen Angriffen.

5 Für die „Entdeckung der Restriktionsenzyme und ihre Anwendung auf Probleme der Molekulargenetik“ wurde 1978 neben Werner Arber und Daniel Nathans auch Hamilton O. Smith der Nobelpreis für Medizin oder Physiologie verliehen, vgl. online unter: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/ [23.03.15].

gezögert hatte: Die Einbringung der rekombinanten DNA in einen anderen Organismus mit dem Ziel, dass diese über die natürlichen zellulären Mechanismen repliziert wird.

Dies gelang Herbert Boyer und Stanley Cohen in unterschiedlichen Experimenten. Der erste rekombinante Organismus war ein *E. coli*-Bakterium, in das Gene anderer *E. coli*-Stämme eingebracht wurden (Cohen et al. 1973). Hierfür isolierten sie aus zwei unterschiedlichen Stämmen jeweils ein Plasmid⁶, das ein Resistenzgen enthielt: aus dem einen Stamm ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Tetrazyklin, aus dem anderen ein Plasmid mit einem Resistenzgen gegen Kanamycin. Die Plasmide wurde mit dem gleichen Restriktionsenzym (EcoRI) geschnitten und verfügten daher alle über komplementär Enden, d. h. über die gleichen „Schnittkanten“, sodass die beiden Plasmide unter der Zugabe von Ligase (einem DNA-verbindenden Enzym) zu einem einzigen Plasmid zusammengefügt werden konnten. Allerdings konnte dabei nicht kontrolliert werden, wie häufig sich die ursprünglichen Plasmide wieder schlossen bevor eine Rekombination stattfand. Nur in einem geringen Anteil der Fälle fand tatsächlich eine Rekombination statt. Ein weiterer *E. coli*-Stamm wurde nun mit Kalziumchloridlösung behandelt, wodurch die Zellen die neuen Plasmide aufnehmen konnten. Auch hier konnte nicht kontrolliert werden, welche Zelle welches Plasmid aufnahm. Daher wurden die Bakterien anschließend den beiden Antibiotika Tetrazyklin und Kanamycin ausgesetzt. Nur diejenigen Bakterien überlebten, die das neue Plasmid mit beiden Resistenzgenen aufgenommen hatten. War aber ein Plasmid einmal aufgenommen, so vervielfältigte sich dieses und wurde auch bei der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben.

Doch Boyer und Cohen gingen noch weiter. Sie zeigten, dass die Möglichkeit eines solchen Gentransfers auch zwischen unterschiedlichen bakteriellen Spezies gegeben ist (Chang et al. 1974) und nicht einmal auf Bakterien beschränkt ist. In einem späteren Experiment transferierten sie mit dieser Methode auch ein Gen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* in ein *E. coli*-Bakterium. Damit war gezeigt, dass ein Gentransfer selbst über sehr weit entfernte Äste des Baums des Lebens hinweg prinzipiell möglich ist. Im Gegensatz zu allen Züchtungsverfahren, bei denen es zur Rekombination von Genen innerhalb einer Art bzw. zwischen nah verwandten Arten kommt, war es nun möglich geworden, auch Gene aus völlig unterschiedlichen Taxa zu rekombinieren.

Ein anhaltendes Problem bestand allerdings darin, dass die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme mit 4-8 Basenpaaren (bp) nur sehr kurz ist. Eine so kurze Sequenz kommt relativ häufig in der DNA vor, weshalb sie bei diesem Verfahren meist in viele kleine Fragmente geschnitten wird, die dann über eine Gelelektrophorese mühsam wieder „sortiert“ werden müssen.

1977 wurde das Peptidhormon Somatostatin als erstes menschliches Polypeptid in einem Bakterium (*E. coli*) exprimiert (Itakura et al. 1977) und nur ein Jahr später gelang dies mit dem humanen Insulingen (Goeddel et al. 1979). Die biotechnologische Herstellung des menschlichen Insulins im industriellen Maßstab für medizinische Bedürfnisse ersetzte bald die Gewinnung dieses Hormons aus Schweinen und weckte große Hoffnung für biotechnologische Anwendungen in weiteren Bereichen.

6 Als Plasmid bezeichnet man nichtchromosomale DNA einzelliger Organismen, die in der Regel ringförmig vorliegt und sich unabhängig von der chromosomal DNA repliziert. In Eukaryoten kommen Plasmide nur selten vor, etwa in Hefepilzen.

Nur wenig später wurde, nach einem längeren Rechtsstreit, auch das erste Patent auf einen gentechnisch veränderten Organismus erteilt, nämlich ein ölabbauendes *Pseudomonas*-Bakterium. Das Patent wurde damals von Ananda M. Chakrabarty eingereicht, einem Mikrobiologen von General Electrics (Itakura et al. 1977). Etwas länger sollte es allerdings dauern, bis höhere transgene Organismen ermöglicht wurden. 1982 beispielsweise präsentierten Richard D. Palmiter, Ralph L. Brinster und ihre Kollegen (Palmiter et al. 1982) eine transgene Maus, bei der ein Strukturgen für einen Wachstumsfaktor aus einer Ratte in befruchtete Eizellen eingebracht wurde. Die sich daraus entwickelnden Mäuse zeigten übermäßiges Wachstum und wurden später als „Supermäuse“ bezeichnet.

Rekombinasen und Recombineering

Im erwähnten Fall des Insulins wurde ein fremdes Gen auf einem Plasmid in ein Bakterium eingebracht. Ein so transferiertes Gen kann dort verbleiben und exprimiert werden. Für andere Anwendungen kann es aber auch nötig sein, ein bestimmtes Gen (oder auch mehrere Gene) für eine stabile Expression in die chromosomale DNA eines Organismus einzubringen, wie dies bei transgenen Mäusen der Fall ist. Zur Herstellung von transgenen Tieren mit „zusätzlich“ eingebrachten Genen wird hierzu die natürlich stattfindende Integration von eingebrachten Gensequenzen an zufälligen Stellen in den Chromosomen verwendet. Zum gezielten Austausch oder Ausschalte bzw. Unterbrechen von Genen findet hingegen die natürlich vorkommende homologe Rekombination Verwendung. Hierfür verwendet man vor allem embryonale Stammzellen, da die homologe Rekombination dort mit relativ hoher Häufigkeit stattfindet. Neue Möglichkeiten ergaben sich diesbezüglich durch die Verwendung von sogenannten Rekombinasen, die ab den 1990er Jahren mehr und mehr für die gentechnische Modifikation von Säugern verwendet wurden. Dabei handelt es sich um Enzyme, die nicht nur in der Lage sind, wie Restriktionsenzyme bestimmte kurze DNA-Abschnitte (Rekombinationselemente) zu schneiden, sondern diese auch gleich wieder neu zu verknüpfen. Auf diese Weise können diese Enzyme die Rekombination von DNA-Abschnitten, die zwischen solchen DNA-Rekombinationselementen liegen, austauschen. Das heißt, anders als bei dem Schneiden durch Restriktionsenzyme und dem anschließenden Verknüpfen der DNA-Stränge durch Ligasen in zwei getrennten Schritten, werden beide Schritte hier von einem einzigen Enzym übernommen, was einen effizienteren Einsatz ermöglicht.

Rekombinasen benötigen aber leider eine schon vorab existierende Erkennungssequenz, an die sie binden können. Will man mithilfe einer Rekombinase ein Gen oder einen längeren DNA-Abschnitt in ein Genom transferieren, so muss dieser an der gewünschten Stelle die entsprechenden Erkennungssequenzen enthalten. Diese müssen also zuvor über andere Methoden eingebracht werden, was als *floxing* bezeichnet wird. Es wurden zwar über Verfahren der *directed evolution* verschiedene Rekombinasen designed, die auch andere Erkennungsstellen binden, doch ist dies sehr aufwendig und kostspielig. Mittlerweile sind mehrere solche Rekombinationssysteme natürlichen Ursprungs bekannt (Cre:loxP System oder Flp:FRT System).

Um die Jahrtausendwende wurde von Francis Stewart und seinen Kollegen am EMBL in Heidelberg schließlich das Recombineering (RecET) entwickelt, das insbesondere dem *Genetic Engineering* von Mäusen großen Vorschub leistete (Copeland et al. 2001). Dabei handelt es sich um eine Methode, die die homologe Rekombination nutzt und dabei we-

der Restriktionsenzyme noch irgendwelche Erkennungssequenzen in der Ziel-DNA benötigt. Das Recombineering ermöglicht damit das Einbringen eines Gens über homologe Rekombination ohne Erkennungssequenzen und kann auch bei sehr langen DNA-Strängen angewendet werden.

Das anfangs von Stewart genutzte RecET-System verwendet effizientere Proteine aus Phagen, die die Frequenz der homologen Rekombination und damit die Effizienz dramatisch steigern (van Kessel et al. 2008). Außerdem genügen beim Recombineering homologe Regionen von lediglich ca. 40 bis 50 bp, die leicht als Oligonukleotide synthetisiert und (über eine Polymerase-Kettenreaktion) an den beiden Enden des einzubringenden DNA-Fragments angebracht werden können.⁷ Da als Oligonukleotid jede beliebige Sequenz leicht synthetisiert werden kann, wird es mit dem Recombineering möglich, das einzubringende DNA-Fragment an jeder gewünschten Stelle zu integrieren und dadurch das Genom an jeder beliebigen Stelle zu verändern.

Damit die Rekombination jedoch stattfinden kann, muss der Exonuklease RecE ein freies DNA-Ende zur Verfügung stehen, damit diese überhaupt an der DNA ansetzen kann. Ein freies DNA-Ende setzt jedoch wiederum einen DNA-Bruch voraus. Wie bereits erwähnt, zählt ein Doppelstrangbruch zu den schwerwiegendsten DNA-Schädigungen. Dennoch versuchen die Methoden, die im Folgenden vorgestellt werden, genau diesen herbeizuführen, um dadurch gezielt eine homologe Rekombination zu forcieren.⁸

Zinkfinger-Nukleasen (ZFN)

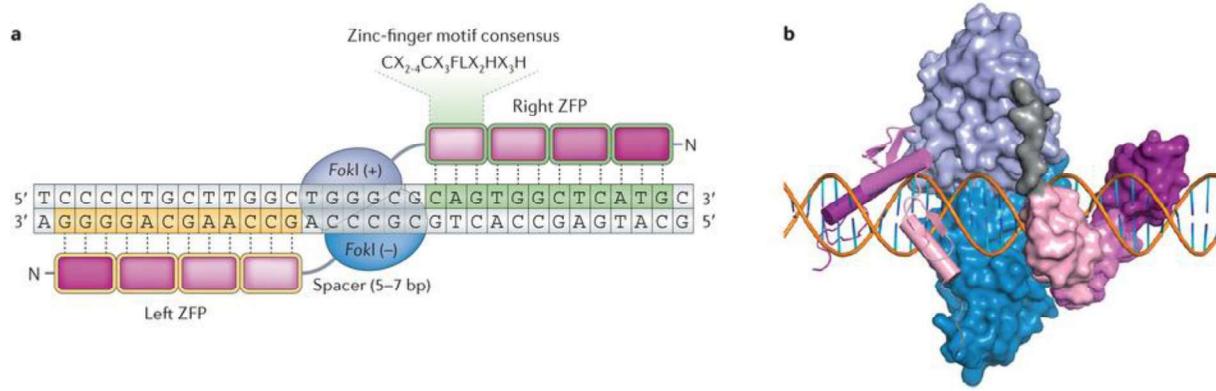
Es ist das Ziel vieler „Werkzeuge“ der Gentechnik, die auch die Synthetische Biologie einsetzt, hochspezifisch an dem gewünschten Ort der Ziel-DNA einen Doppelstrangbruch zu verursachen. Denn ein Doppelstrangbruch erhöht die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer homologen Rekombination dramatisch. Dabei ist es zunächst egal, ob es sich um eine Modifikation der DNA von Bakterien oder der des Menschen handelt. Das Prinzip ist stets das gleiche, allerdings treten je nach Zelltyp beispielsweise sehr unterschiedliche Effizienzgrade auf (Urnov et al. 2010).

Um einen Doppelstrangbruch gezielt zu erzeugen, werden mittlerweile neben Restriktionsenzymen und Rekombinasen weitere, effizientere Nukleasen – sogenannte Hybrid-Nukleasen – eingesetzt, die auch als „molekulare Scheren“ bezeichnet werden. Die erste dieser hochspezifischen Nukleasen, die hier erwähnt werden soll, ist die sogenannte Zinkfinger-Nuklease, die aus einer Zinkfinger-Bindedomäne und einer Nuklease-Domäne bestehen. Während die Bindedomäne dafür sorgt, dass das Protein an die gewünschte Stelle der DNA bindet, ist die Nuklease dafür zuständig, diese zu schneiden, d. h. einen Doppelstrangbruch zu verursachen.

7 Oligonukleotide sind sehr kurze Nukleotidstränge von zumeist nicht mehr als 20 bis 25 Nukleotiden Länge. Eine Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren, mit dem sich DNA-Abschnitte enzymabhängig vervielfältigen lassen.

8 Ein Doppelstrangbruch wird auch häufig genutzt, um durch das *non-homologe end joining* Gene gezielt auszuschalten, was dann zu sogenannten *knock-out* Varianten von Organismen führt, die in der Forschung eine große Rolle spielen. Auf das Abschalten von Genen wird in diesem Beitrag aber nicht weiter eingegangen.

Zinkfinger sind Proteine und gehören zu den häufigsten Strukturelementen in Eukaryoten überhaupt. Sie wurden erstmals in einem Transkriptionsfaktor im Krallenfrosch entdeckt und sind in der Lage, sehr spezifisch an DNA (oder RNA) zu binden. Jeder Zinkfinger bindet spezifisch an ein bestimmtes Basen-Triplett. Da aber jedes Basen-Triplett extrem häufig in einem Genom bzw. auf einem Chromosom vorkommt, bindet er an sehr vielen Orten und kann daher nicht zielgenau verwendet werden. Damit bindet eine einzelne Zinkfinger-Domänen zwar spezifisch, aber an viele Loci. Glücklicherweise besteht allerdings die Möglichkeit, mehrere solcher Zinkfinger zu einer Zinkfinger-Domäne zu vereinen und diese sozusagen modular aufzubauen. Dies erlaubt es, maßgeschneiderte Bindedomänen zu designen. Um jedes mögliche Basen-Triplett binden zu können, sind 64 (4^3) verschiedene Zinkfinger nötig. Kombiniert man sechs dieser Zinkfinger à 3 bp (also eine Bindedomäne von 18 bp) miteinander, so erhält man eine Sequenz mit einer Spezifität von 4^{18} . Rein statistisch betrachtet bedeutet dies, dass die Bindesequenz einer derart modular aufgebaute Bindedomäne selbst in einem Genom, das etwa zwanzig Mal so lang wäre wie das menschliche, nur ein einziges Mal vorkommt. Damit wird die Bindedomäne spezifisch für nahezu einen einzigen Ort im Genom. Diese hochspezifische Binde-Domäne wird nun mit einer unspezifischen Nuklease-Domäne, wie etwa Fok I (einer Restriktionsendonuklease = einem Restriktionsenzym) gekoppelt, wodurch ein zielgenaues Schneiden ermöglicht wird. FokI wiederum schneidet nur als Dimer, d. h. wenn sich zwei solche Domänen verbinden. Dies bietet die Möglichkeit, Zinkfinger-Domänen in beiden Leserichtungen des DNA-Stranges mit der Nukleaseeinheit zu hybridisieren, wodurch die Spezifität nochmals gesteigert werden kann (vgl. Abbildung 3).



Nature Reviews | Genetics

Abbildung 3a) Schematische Darstellung eines Zinkfingernuklease-Dimers. Jede der beiden Zinkfingernukleasen ist aus einem Zinkfingerprotein und einer FokI-Nuklease zusammengesetzt. Jedes Zinkfinger-Motiv bindet an 3 aufeinanderfolgende Basen der Zielsequenz, die in der Regel 18-36 Basen umfasst. b) Computer-Modell der Struktur eines Zinkfingernuklease-Dimers, das an die DNA gebunden ist. Jeder Zinkfinger ist pink (als Bändermodell; links und als Kalottenmodell; rechts) abgebildet. Die katalytischen FokI-Domänen sind blau und lila als Kalottenmodell in der Mitte zu sehen.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Genetics (Kim & Kim 2014), copyright (2014).

Ein großes Problem dieses Verfahrens bleibt jedoch immer noch das sogenannte off-target-Schneiden, d. h., dass es trotz der prinzipiellen Spezifität immer noch zu Fehlern kommen kann und die DNA abseits vom Zielort zertrennt wird, was zumeist schwerwiegende Folgen hat. Insbesondere wenn es sich um therapeutische Anwendungen beim

Menschen handelt, können solche Fehler dramatische toxische Auswirkungen haben. Einige Jahre lang war die Zinkfinger-Protein-Technologie die einzige Möglichkeit, um *custom site-specific* DNA-Binding-Proteine und Enzyme herzustellen. Dies hat sich mittlerweile geändert, wie die nächsten beiden Abschnitte zeigen werden. In Arbeiten der Synthetischen Biologie werden Zinkfinger-Nukleasen aber noch immer angewendet (Lu et al. 2009).

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

Ähnlich wie Zinkfinger-Nukleasen sind auch TALENs in der Lage, gezielt Doppelstrangbrüche der DNA herbeizuführen. TAL-Effectors sind natürlich vorkommende Proteine aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Xanthomonas*, sie stammen also nicht aus einem Abwehrmechanismus. Diese Effectors werden von den Bakterien in Pflanzen injiziert und gelangen dort in die Zellkerne, wo sie an effektorspezifische Promotor-Regionen binden, um die Transkription zu aktivieren. Das heißt, sie greifen in die Steuerung der Wirtspflanze ein und verändern, wie die jeweiligen Gene abgelesen und in Protein übersetzt werden. Dies führt wahrscheinlich zur Kolonisierung der Pflanzen durch die Bakterien. TALENs werden in allen unterschiedlichen Domänen des Baums des Lebens angewendet (Sun & Zhao 2013), mittlerweile selbst in menschlichen (induzierten) pluripotenten Stammzellen (Chiba & Hockemeyer 2015).

Wie Zinkfinger-Nukleasen sind auch die Bindedomänen der TAL-Effectors modular aufgebaut. Sie sind aus einer Reihe von Repeat-Domains zusammengesetzt, die 33 bis 35 Aminosäuren lang sind. Jede einzelne dieser Domänen bindet spezifisch an ein einzelnes Nukleotid der DNA. Insgesamt ist die Struktur der Bindedomäne hoch konserviert, doch an Position 12 und 13 ist sie variabel. Und genau diese beiden Aminosäuren bestimmen die Spezifität für ein bestimmtes Nukleotid. Diese einzelnen Bindedomänen können, wie die Zinkfingerdomänen, miteinander kombiniert und aneinandergehängt werden (vgl. Abbildung 4).

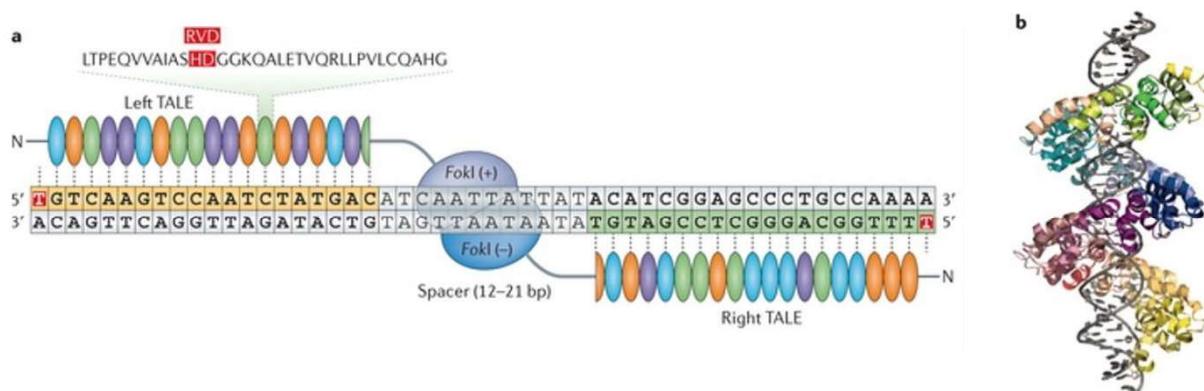


Abbildung 4a) Schematische Darstellung eines Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) Dimers. Jeder TALE-Repeat ist aus 33 bis 35 Aminosäuren zusammengesetzt, die (durch die Aminosäuren 12 und 13) jeweils eine einzelne Base erkennen. Zielsequenzen von TALEN-Dimeren umfassen in der Regel 30 bis 40 Basen. b) Computermodell der dreidimensionalen Proteinstruktur einer an die DNA angelagerten TALEN.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Genetics* (Kim & Kim 2014), copyright (2014).

Der große Vorteil gegenüber den Zinkfinger-Nukleasen besteht darin, dass TALE-Bindedomänen leichter designt werden können, da ein TALE ein einzelnes Basenpaar bindet, während ein Zinkfinger-Protein gleich drei Basenpaare bindet.

Ebenso wie Zinkfinger-Domänen können auch TALEs mit einer Endonuklease (z.B. FokI) fusioniert werden, woraus sich dann eine TALEN ergibt. Auch hier fusionieren wieder zwei FokI-Domänen zu einem Dimer, weshalb ein TALEN-Paar benötigt wird, um einen Doppelstrangbruch zu verursachen. Die dimerisierte Nuklease stellt das Verbindungsstück zwischen den beiden Bindedomänen dar. Dabei ist es aber auch möglich, unterschiedliche Arten von Bindedomänen zu einer Hybridnuklease zu kombinieren. Yan und Kollegen (Yan et al. 2013) konnten 2013 zeigen, dass durch die Kombination einer Zinkfingerdomäne und einer TALE die Effizienz nochmals gesteigert werden kann.

Prinzipiell ist es möglich, nicht nur Nukleasen mit den Bindedomänen zu fusionieren. Es können ganz unterschiedliche Effektor-Domänen angehängt werden, die für das Einbringen bzw. das Ein- oder Ausschalten eines Gens genutzt werden. Dadurch können „synthetische“ Transkriptionsfaktoren oder epigenetische Modulatoren hergestellt werden, mit denen die Expressionsrate von Genen im Genom spezifisch reguliert werden kann.

Der Nachteil der TALENs besteht darin, dass es immer noch sehr arbeitsaufwendig und kostspielig ist, lange TALE-Ketten zu konstruieren, die für eine höhere Spezifität notwendig sind. Ferner können sie Immunreaktionen auslösen. Ein weiterer Nachteil ist, dass TALENs zwar vergleichsweise einfacher hergestellt werden können als ZFNs, sich aber eventuell nur schwerer in die gewünschten Zellen einbringen lassen. (Gaj et al. 2013, S. 402). Dies geschieht entweder über virale Vektoren oder die DNA, die für die Nukleasen kodiert, wird mittels Plasmiden in die Zelle eingebracht. Doch TALEs können nicht nur in Form von DNA, sondern auch als mRNA in die Zelle eingebracht werden. Dies bietet den Vorteil, dass mRNA nicht in das Genom integriert wird. Es bleibt jedoch das Problem bestehen, dass das Einbringen durch Elektroporation oder über kationische Lipid-basierte Reagenzien toxisch sein kann und auf bestimmte Zelltypen beschränkt bleibt, was zu einer Verringerung der Effektivität führt (Gaj et al. 2013).

Dennoch ist diese Methode im Vergleich zu älteren Ansätzen sehr kostengünstig. Mittlerweile liegen die Kosten für mehrere hundert TALEs pro Tag bei lediglich 5 US-Dollar (Liang et al. 2013).

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Ein weiterer großer Schritt in Richtung Effizienzsteigerung bei der Verursachung von Doppelstrangbrüchen und eine Erleichterung der Handhabbarkeit wurde erst in den letzten beiden Jahren durch die CRISPR/Cas Methode erreicht. Bereits Ende der 1980er Jahre hatte man im Genom von Bakterien kurze, sich wiederholende Sequenzen entdeckt, die von anderen Sequenzen, sogenannten Spacern, unterbrochen werden. Spacer und Repeats sind nur ca. 30 bis 35 bp lang. Erst Anfang des Jahrtausends folgte dann (ca. 2002 bis 2005) die Entdeckung, dass diese kurzen, einzigartigen Spacer-Sequenzen mit Sequenzen aus dem Genom von Viren übereinstimmen. Was die Forscher entdeckt hatten, war eine Art bakterielles Immunsystem. Im Gegensatz zu den TALE-Effektors, die

aus einem pathogenen Organismus entstammen, handelt es sich bei CRISPR/Cas – wie bei Restriktionsenzymen auch – um ein System aus einem Abwehrmechanismus. Wie funktioniert dieses System?

Wird ein Bakterium von einem Phagen (ein Virus, das Bakterien infiziert) befallen, der seine DNA in das Bakterium injiziert, exprimieren die sogenannten Cas-Gene des Bakteriums einen Proteinkomplex, der die fremde DNA in viele kurze Stücke schneidet, die sogenannten Spacer. Diese Spacer werden in das Bakteriengenom integriert, wobei zwischen ihnen repetitive Sequenzen eingebaut werden. Damit wird quasi die Erkennungssequenz gespeichert, die es ermöglicht, bei einer erneuten Infektion eine schnellere Immunantwort liefern zu können. Diese quasi-Immunantwort besteht darin, dass die Spacer-Repeat-DNA in eine pre-CRISPR-RNA transkribiert und diese dann so prozessiert wird, dass Komplexe aus kleineren RNA-Molekülen entstehen, die über die Spacer homolog zur viralen DNA sind. Diese Hybride verbinden sich nun mit dem Cas9 Protein (einer Endonuklease), der so entstandene Komplex bindet mit der Spacer-Sequenz (ca. 30 bp) komplementär zum viralen DNA-Strang und schneidet beide Stränge der viralen DNA.⁹ Dabei handelt es sich um sehr kurze Abschnitte, die somit häufig auftauchen, weshalb quasi jede Sequenz in Teile geschnitten und unwirksam gemacht werden kann (vgl. Abbildung 5).

Wie lässt sich dieser Mechanismus gentechnisch nutzen? Martin Jinek, Emmanuelle Charpentier und Kollegen ist es 2012 gelungen, sich das beschriebene System zunutze zu machen, indem sie ein RNA-Molekül – die guide RNA (gRNA) – designten (Jinek et al. 2012). Dieses designierte, synthetische Molekül ersetzte den natürlich vorkommenden Duplex aus crRNA:tracrRNA, der für die Bindung an die virale DNA zuständig ist. Damit ist es möglich, eine Bindesequenz zu entwerfen, die passend ist für jede gewünschte DNA (Charpentier & Doudna 2013) und nicht nur, wie ursprünglich im bakteriellen Immunsystem, für die virale DNA, die abgewehrt werden soll (vgl. Abbildung 6).

9 Damit der entstandene Komplex nicht die eigene DNA des Bakteriums schneidet muss in der viralen DNA noch eine PAM-Sequenz vorhanden sein, die im bakteriellen Genom fehlt.

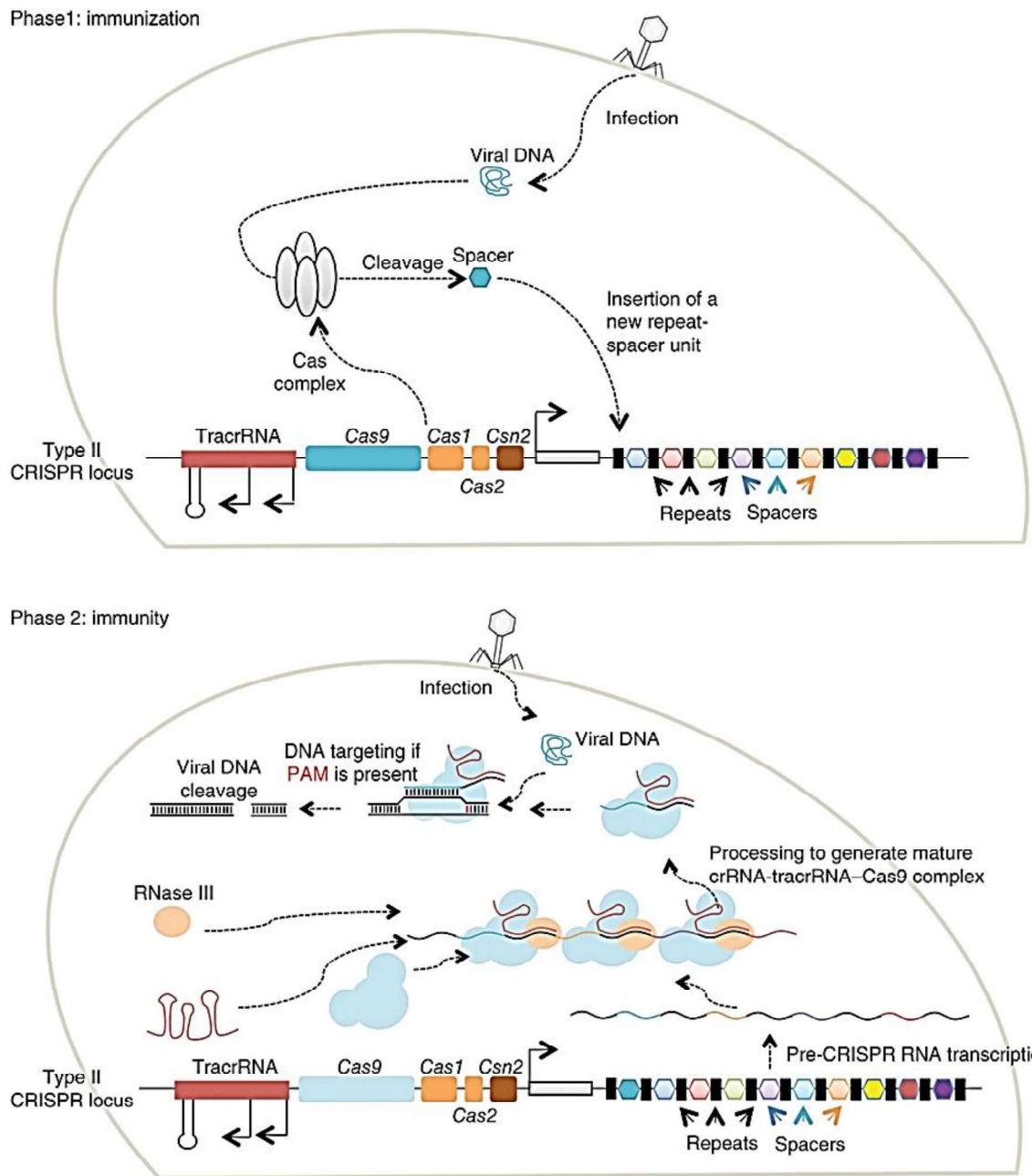


Abbildung 5) Phase 1: Immunisierung. Das CRISPR-System schneidet die eindringende Phagen-DNA und integriert die entstehenden Fragmente in das Bakteriengenom als Spacer, um so die molekulare Signatur der Infektion zu speichern. Phase 2: Immunität. Das Bakterium nutzt die so gespeicherte Information über eine frühere Infektion, um sich gegen eindringenden Pathogene zu verteidigen. Hierfür wird der entsprechende DNA-Abschnitt transkribiert und das Transkript zu CRISPR RNAs (crRNAs) prozessiert, indem tracrRNA mit den Repeat Regionen hybridisiert und zusammen mit Cas9 Proteinen einen Komplex bilden. Die endogene RNase III setzt die einzelnen Komplexe frei. Die entstandenen reifen crRNA-tracrRNA-Cas9-Komplexe binden mit der Spacer-Region an die komplementären „Protospacer“ Sequenzen der viralen DNA, falls dort eine PAM Sequenz vorhanden ist, und zerschneiden sie.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Mali et al. 2013), copyright (2013)

Auch dieses Verfahren lässt sich auf alle Organismen anwenden und wurde 2013 von Feng Zhang im Labor von George Church schon bei Säugern (Maus, Menschenzellen) eingesetzt. Die Raten des verursachten Doppelstrangbruchs und der homologen Rekombination scheinen genauso hoch oder höher zu sein, verglichen mit der Verwendung von Zinkfingernukleasen oder TALENs (Esveld & Wang 2013). Allerdings kommen wohl noch häufiger Schnitte an nichtintendierten Stellen (*off-target cuts*) vor, sodass ZFN und TALEN noch nicht vollständig ersetzt werden können (Carroll 2013).

Auch CRISPR/Cas ist eine Technik, um einen Doppelstrangbruch zu verursachen bzw. um eine Effektordomäne spezifisch an eine Ziel-DNA zu binden. Der große Vorteil besteht jedoch darin, dass für diese Methode kein aufwendiges Protein-Engineering für die Erkennungssequenzen mehr notwendig ist, wie das bei Zinkfingerdomänen und TALENs der Fall ist. Stattdessen müssen hier lediglich kurze RNA-Moleküle designt werden, was einen erheblich geringeren Aufwand mit sich bringt. Diese Methode ermöglicht eine weitere Steigerung der Präzision und Reduzierung des Arbeits- und Kostenaufwands. Sie stellt zwar keine qualitativ andere Methode dar, dennoch können die Folgen, die eine solche Erleichterung in der Handhabung und in der Verfügbarkeit mit sich bringt, erheblich sein.

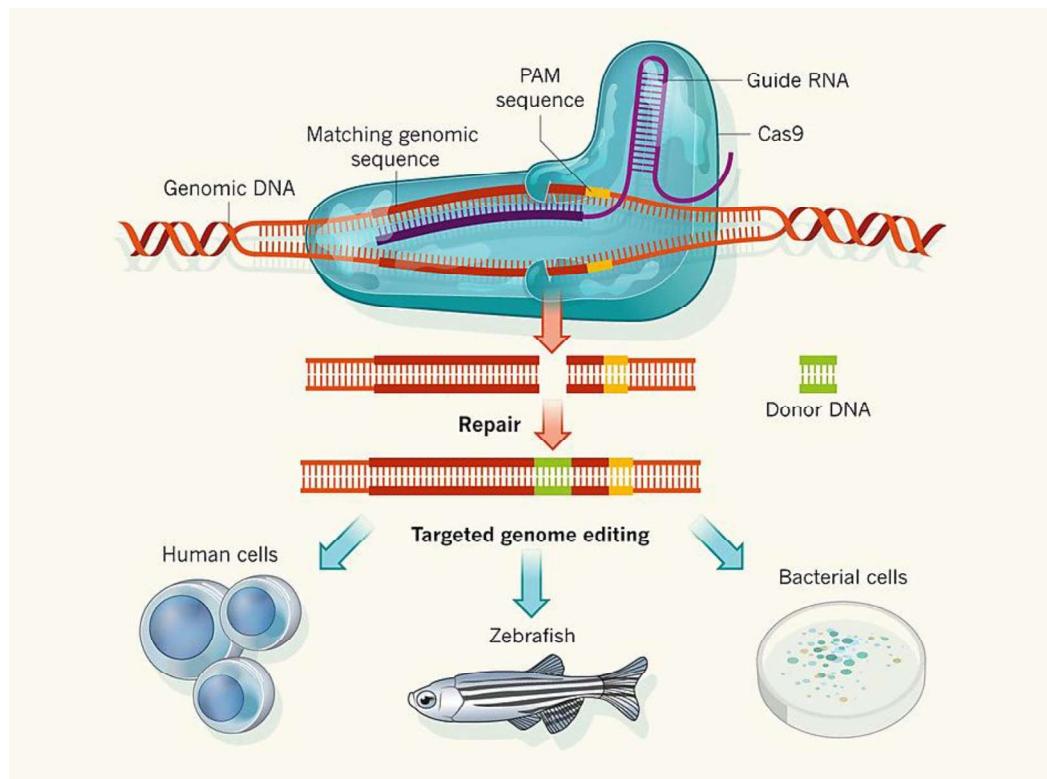


Abbildung 6) Komplex aus Cas9-Nuklease und designer guideRNA (gRNA). Durch maßgeschneiderte gRNA ist es möglich, die Cas9-Nuklease an den gewünschten Ort im Genom zu bringen und dort präzise einen Doppelstrangbruch zu verursachen. Wird zusätzlich ein passender DNA-Abschnitt bereitgestellt, so wird diese Donor-DNA dort mit erhöhter Wahrscheinlichkeit durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Dieses Verfahren wurde bereits bei unterschiedlichen Zelltypen und Organismen angewendet.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Charpentier und Doudna 2013), copyright (2013)

MAGE (Multiplex Automated Genome Engineering)

Bis hierher wurden in diesem Beitrag Methoden dargestellt, bei denen Doppelstrang-Sequenzen eingebracht wurden. Geschieht dies nur an einer Stelle des Genoms – wird etwa nur ein einzelnes artfremdes Gen in einen Organismus eingebracht – so würde man wahrscheinlich nicht von Synthetischer Biologie, sondern von herkömmlicher Gentechnik sprechen. Neuere Verfahren, zu denen auch CRISPR/Cas gehört, erlauben es jedoch, Genome an vielen Stellen gleichzeitig zu verändern. MAGE ist ein solches Verfahren, das gleichzeitig mehrere Loci der DNA adressiert und das auch in größerem Maßstab verwendet werden kann.

Dabei handelt es sich um einen zyklischen Prozess, das heißt, das Ergebnis eines Durchgangs wird zum Ausgangspunkt eines neuen Zyklus verwendet, wodurch sukzessive Veränderungen der DNA eintreten. Für diese schrittweise Veränderung werden immer wieder neue Oligonukleotide in den zyklischen Prozess eingebracht.

Es handelt sich also um ein Verfahren, bei dem eine große Zahl von genetischen Veränderungen an mehreren definierten Stellen im Genom (z. B. in Genen für einen bestimmten Biosyntheseweg) hervorgerufen wird. Unterschiedliche Veränderungen bzw. Kombinationen solcher Veränderungen können zu unterschiedliche Auswirkungen auf ein bestimmtes Merkmal führen. Die Kombination von Veränderungen, die schließlich zu einem gewünschten Merkmal führt, wird immer wieder selektiert, weshalb es sich hierbei um einen quasi-evolutionären Prozess handelt, der auch als *directed evolution* bezeichnet wird. Welche Sequenz die Veränderungen aber genau mit sich bringen, ist nicht vorab definiert.

Eines der bekanntesten Beispiele für die Anwendung dieses Verfahrens stammt von einer Arbeitsgruppe um George Church (Wang et al. 2009), die es benutztten, um den 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DPX) Stoffwechsel in *E. coli* zu optimieren, und somit eine Überproduktion des industriell wichtigen Isoprenoids Lykopin (Farbstoff aus Tomaten) zu erreichen. Von 20 Genen war bekannt, dass sie an der Lykopinsynthese beteiligt sind. Diese Gene sollten in ihrer Ribosomen-Bindestelle optimiert werden, um ein besseres Ablesen zu ermöglichen. Von weiteren drei Genen war bekannt, dass sie an Sekundärstoffwechseln beteiligt sind und damit dafür sorgen, dass Zwischenprodukte aus dem gewünschten Stoffwechsel abgeführt werden. Diese drei Gene galt es daher auszuschalten. Während bei früheren Versuchen all diese Gene jeweils einzeln adressiert worden waren, sollten nun alle gleichzeitig modifiziert werden.

Da degenerierte Oligonukleotide verwendet wurden, das heißt Oligonukleotide mit einer geringfügig unterschiedlichen Basenfolge, wurde die ursprüngliche DNA mit zunehmender Anzahl an Zyklen immer weiter verändert. Je größer die Ähnlichkeit der eingebrachten Oligonukleotide zur ursprünglichen Sequenz war, desto besser gelang der Einbau. Mit der Anzahl der Zyklen entfernte sich die neue Sequenz immer weiter vom von der ursprünglichen Sequenz. Dieses Verfahren führte in 35 Zyklen über drei Tage hinweg zu 15 Mrd. genetischen Varianten, von denen nach einem Screening mehrere Stämme tatsächlich einen erhöhten Lykopinertrag verzeichneten. In einem Stamm konnte ein über viermal so hoher Ertrag erzielt werden wie in dem Ausgangsstamm.

Das MAGE-Verfahren stellt den Versuch dar, die Natur in ihrem evolutionären Prozess zu imitieren und auf diese Weise neue aktive Komponenten herzustellen. Der Prozess soll jedoch beschleunigt im Labor ablaufen. Im Prinzip kann für das Multiplexen jede

Technik genutzt werden, die DNA in ein Genom einbringt (also auch alle anderen bereits besprochenen)¹⁰, die Einzelstrang-Oligonukleotide haben sich jedoch als am effektivsten erwiesen, um parallel eine große Zahl von ungerichteten Varianten in definierten Genen zu erzeugen.

MAGE, das auf multiple Genommanipulationen ausgelegt ist, ist damit eine Technologie, die komplementär ist zu Verfahren der *de novo* Synthese ganzer Genome, die nun abschließend noch kurz vorgestellt werden.

***De novo* Genomsynthese**

Die bis hierher vorgestellten Methoden zielen alle auf die Modifikation von bereits vorhandener DNA ab. Die Synthetische Biologie will jedoch mehr. Ihre Vision sind vollständig am Reißbrett entworfene Organismen. Die Modifikation bestehender DNA soll durch die vollständige Neusynthese ersetzt werden. Dies beinhaltet, zunächst die neue DNA computerbasiert zu entwerfen, bevor sie dann physisch synthetisiert werden kann. Hier soll nun weniger auf den ersten, hochkomplexen und noch weitgehend hypothetischen Schritt – die rechnerbasierte Konzeption eines neuen Genoms – eingegangen werden, als vielmehr auf gentechnische Verfahren der DNA-Synthese.

Auch hier zeigt sich, dass die Synthetische Biologie der letzten zehn Jahre in der Kontinuität von biotechnologischen Vorläufern steht und keinen völligen Bruch darstellt. Einen ersten Meilenstein auf diesem Weg setzten 1995 Willem Stemmer und Kollegen, als sie aus 134 Oligonukleotiden (40-mer) ein 2,7 kb langes Plasmid synthetisierten. Quasi die gleiche Technik nutzten auch noch 2002 Eckard Wimmer und Kollegen (Cello et al. 2002), die chemisch die cDNA¹¹ des Poliovirus ohne eine natürliche Vorlage synthetisierten, was ein wissenschaftliches Novum darstellte. Zwar wurde dieses Genom nicht entworfen, denn die DNA-Sequenz entsprach der des natürlich vorkommenden Virus. Doch wurde kein materieller DNA-Strang als Kopiervorlage für die Synthese zu Hilfe genommen, weshalb dieses Verfahren als *de novo* Synthese bezeichnet werden kann. Stattdessen verwendeten sie synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 70 Nukleotiden¹². Diese fügten sie zu drei Fragmenten zusammen, die jeweils eine Länge von 400 bis 600 bp besaßen. In einem dritten Schritt wurden die Fragmente schließlich in einem Plasmidvektor miteinander verbunden. Das Virus, das sie mit Hilfe der von diesem Plasmid abgelesenen RNA und Zellextrakten im Reagenzglas (*in vitro*) „synthetisierten“, war nicht nur in seiner Sequenz eine Kopie des natürlichen Genoms. Das so hergestellte Virus war auch tatsächlich infektiös, wie ein Versuch an Mäusen belegen sollte.

Seit diesem ersten vollständig synthetisierten Genom wurden auch zahlreiche andere und längere Genome synthetisch nachgebaut. Bemerkenswert ist jedoch nicht nur die Steigerung der Länge der synthetisierten Genome. Kurz nachdem Wimmer und seine

10 CRISPR/Cas lässt sich auch Multiplexen, indem mehrere synthetische RNAs auf einmal verwendet wurden, um an mehreren Stellen gleichzeitig einen Doppelstrangbruch zu erzeugen (Cong et al. 2013).

11 Bei Polio handelt es sich zwar eigentlich um einen RNA-Virus. Doch da die RNA instabil ist, wurde zunächst die entsprechende cDNA hergestellt, von der dann wieder eine RNA-Komplementärstruktur synthetisiert wurde.

12 Oligonukleotide lassen sich chemisch synthetisieren, allerdings ist schon bei einer Länge von 300 bis 600 bp der Ertrag äußerst gering.

Mitarbeiter ihre Studie veröffentlicht hatten, meldeten Hamilton O. Smith, Clyde A. Hutchison, Cynthia Pfannkoch und J. Craig Venter (Smith et al. 2003), dass es ihnen gelungen war, das Genom des Bakteriophagen φX174 zu synthetisieren. Dieses ist mit ca. 5,3 kbp zwar kleiner als das ca. 7,5 kbp lange Genom des Poliovirus. Doch während die Arbeitsgruppe um Eckard Wimmer für ihre Synthese mehrere Monate gebraucht hatte, benötigten Venter und Kollegen dank eines anderen Verfahrens lediglich 14 Tage.

Zwei weitere Arbeiten der Synthetischen Biologie sind besonders hervorzuheben: 2008 und 2010 gelang es Daniel Gibson und seinen Kollegen vom J. Craig Venter Institute, die Genome zweier unterschiedlicher *Mycoplasma*-Bakterien zu synthetisieren, die eine Länge von 583 kbp (Gibson et al. 2008) bzw. 1,08 Mbp (Gibson et al. 2010) besaßen. Dies bedeutete einen Sprung um ca. das 18-fache bzw. das 36-fache gegenüber der längsten bis dahin synthetisierten DNA Sequenz von Kodumal et al. (2004) mit ca. 32 kbp¹³. Der große Vorteil des von Daniel Gibson entwickelten und nach ihm benannten „Gibson Assembly“ besteht darin, dass es nun möglich wurde, mehrere zuvor getrennte Arbeitsschritte bei gleichbleibender Temperatur zu einem einzigen Arbeitsgang zusammenzufassen. Damit wurde es möglich, Fragmente von mehreren hundert Kilobasen Länge, die kurze, überlappende Bereiche aufweisen, miteinander zu verbinden.

Im zweiten Fall war es den Forschern nicht nur gelungen, ein derart langes Genom zu synthetisieren. Sie brachten dieses Genom auch in ein Bakterium einer verwandten Art ein, das sie zuvor von seinem Erbgut befreit hatten. Diese „synthetische Zelle“ war weiterhin in der Lage, sich zu replizieren, was zu den bisher größten Erfolgen der Synthetischen Biologie zählt. Vom visionären Ziel der Synthetischen Biologie, ein vollständig neues Genom *in silico* zu designen und anschließen in einer Zelle zu „booten“ – so Craig Venters Formulierung – ist man jedoch derzeit noch sehr weit entfernt.

Zusammenfassung und Ausblick

Worauf es in diesem Beitrag ankam, war zu zeigen, dass es sich bei der Entwicklung der Verfahren der Synthetischen Biologie um einen kontinuierlichen Entwicklungsprozess handelt und dass diese Methoden im Prinzip keine qualitativen Neuerungen darstellen. Stattdessen werden natürliche Mechanismen wie der der homologen Rekombination gezielt herbeigeführt und genutzt. Dabei besteht die Fortentwicklung zumeist in einer größeren Präzision und einer höheren Effizienz; sowie nicht zuletzt in einer Reduzierung des Arbeitsaufwands und der anfallenden Kosten. Dabei stellt sich dann letztlich aber dennoch die Frage, wann eine quantitative Veränderung in eine qualitative umschlägt.

Fraglich ist ebenso, wie solche Methoden im Hinblick auf ihr Risikopotential und ihre ELSA-Implikationen¹⁴ zu bewerten sind (König et al. 2013). Bewertet werden müssten allerdings vielmehr die so entstehenden lebenden Systeme bzw. Organismen, die mit solchen Methoden erzeugt bzw. hergestellt werden. Dennoch darf nicht aus den Augen verloren werden, dass die beständige Erleichterung der Anwendbarkeit auch den Kreis derer erweitert, die sich gentechnischer Methoden bedienen können. Die Senkung von Kosten für derartige Anwendungen führt ebenso dazu, dass dieser Kreis erweitert wird.

13 Hierbei handelte es sich um ein Polyketid-Synthase-Gencluster.

14 ELSA steht für *Ethical, Legal and Societal Aspects*.

Hier ist zu fragen, ob auf andere Weise dieser Entwicklung gegengesteuert werden sollte und falls ja, wie dies bewerkstelligt werden kann. Beispielsweise könnte über eine gesetzliche Regulierung der Zugang zum benötigten Instrumentarium kontrolliert oder restriktiv werden. Doch auch die Do-it-yourself-Community im Bereich der Synthetischen Biologie findet wachsendes Interesse, was derartige Maßnahmen erschweren könnte. Weitere Fragen ergeben sich dahingehend, wie die Anwendung derartiger Methoden unseren Umgang mit Organismen prägt und verändert.

Danksagung

Für hilfreiche Diskussionen und Anmerkungen bei der Ausarbeitung dieses Manuskripts danke ich meinen Kollegen Reinhard Heil und Harald König.

Literatur

- Beurton, P. (2005): Genbegriffe, in: Krohs, U. & Toepfer, G. (Hrsg.): Philosophie der Biologie. Eine Einführung. Suhrkamp, Frankfurt am Main. 195–211.
- Blumenberg, H. (1981): Die Lesbarkeit der Welt. Suhrkamp, Frankfurt am Main.
- Cello, J./ Paul, A. V./ Wimmer, E. (2002): Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template, in: Science 297 (5583). 1016–1018.
- Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1974): Genome construction between bacterial species *in vitro*: Replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences 71 (4). 1030–1034.
- Charpentier, E. & Doudna, J. A. (2013): Biotechnology. Rewriting a genome, in: Nature 495 (7439). 50–51.
- Chiba, K. & Hockemeyer, D. (2015): Genome editing in human pluripotent stem cells using site-specific nucleases, in: Pruetz-Miller, S. M. (Hrsg.): Chromosomal mutagenesis, Bd. 1239. Springer, New York. 267–280.
- Cohen, S. N./ Chang, A. C./ Boyer, H. W./ Helling, R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70 (11). 3240–3244.
- Cong, L./ Ran, F. A./ Cox, D./ Lin, S./ Barretto, R./ Habib, N./ Hsu, P. D./ Wu, X./ Jiang, W./ Marraffini, L.A./ Zhang, F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, in: Science 339 (6121). 819–823.
- Copeland, N. G./ Jenkins, N. A./ Court, D. L. (2001): Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics, in: Nature reviews. Genetics 2 (10). 769–779.
- Esvelt, K. M. & Wang, H. H. (2013): Genome-scale engineering for systems and synthetic biology, in: Molecular Systems Biology 9, 1–17.
- Gaj, T./ Gersbach, C. A./ Barbas, C. F. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, in: Trends in Biotechnology 31 (7). 397–405.

Gibson, D. G./ Benders, G. A./ Andrews-Pfannkoch, C./ Denisova, E. A./ Baden-Tillson, H./ Zaveri, J. et al. (2008): Complete chemical synthesis, assembly and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome, in: Science 319 (5867). 1215–1220.

Gibson, D. G./ Glass, J. I./ Lartigue, C./ Noskov, V. N./ Chuang, R.-Y./ Algire, M. A./ Benders, G. A./ Montague, M. G./ Ma, L./ Moodie, M. M./ Merryman, C./ Vashee, S./ Krishnakumar, R./ Assad-Garcia, N./ Andrews-Pfannkoch, C./ Denisova, E. A./ Young, L./ Qi, Z.-Q./ Segall-Shapiro, T. H./ Calvey, C. H./ Parmar, P. P./ Hutchison, C. A./ Smith, H. O./ Venter, J.C. (2010): Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome, in: Science 329 (5987). 52–56.

Goeddel, D. V./ Kleid, D. G./ Bolivar, F./ Heyneker, H. L./ Yansura, D. G./ Crea, R./ Hirose, T./ Itakura, A. K./ Riggs, A. D. (1979): Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76 (1). 106–110.

Itakura, K./ Hirose, T./ Crea, R./ Riggs, A. D./ Heyneker, H. L./ Bolivar, F./ Boyer, H. W. (1977): Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, in: Science 198 (4321). 1056–1063.

Jinek, M./ Chylinski, K./ Fonfara, I./ Hauer, M./ Doudna, J. A./ Charpentier, E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, in: Science 337 (6096). 816–821.

Kodumal, S. J./ Patel, K. G./ Reid, R./ Menzella, H. G./ Welch, M./ Santi, D. V. (2004): Total synthesis of long DNA sequences. Synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (44). 15573–15578.

König, H./ Frank, D./ Heil, R./ Coenen, C. (2013): Synthetic Genomics and Synthetic Biology applications between hopes and concerns, in: Current Genomics 14 (1). 11–24.

Liang, J./ Chao, R./ Abil, Z./ Bao, Z./ Zhao, H. (2013): FairyTALE: A high-throughput TAL effector synthesis platform, in: American Chemical Society Synthetic Biology 3 (2). 67–73.

Lu, T. K./ Khalil, A. S./ Collins, J. J. (2009): Next-generation synthetic gene networks, in: Nature biotechnology 27 (12). 1139–1150.

Palmeter, R. D./ Brinster, R. L./ Hammer, R. E./ Trumbauer, M. E./ Rosenfeld, M. G./ Birnberg, N. C./ Evans, R. M. (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, in: Nature 300 (5893). 611–615.

Rheinberger, H.-J. (2000): Kurze Geschichte der Molekularbiologie, in: Jahn, I. & Krausse, E. (Hrsg.): Geschichte der Biologie. Theorien, Methoden, Institutionen, Kurzbiographien. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin. 642–663.

Smith, H. O./ Hutchison, C. A./ Pfannkoch, C./ Venter, J. C. (2003): Generating a synthetic genome by whole genome assembly: φX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides, in: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (26). 15440–15445.

- Sun, N. & Zhao, H. (2013): Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing, in: Biotechnology and Bioengineering. 110 (7). 1811–1821.
- Urnov, F. D./ Rebar, E. J./ Holmes, M. C./ Zhang, H. S./ Gregory, P. D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases, in: Nature Reviews Genetics 11 (9). 636–646.
- van Kessel, J. C./ Marinelli, L. J./ Hatfull, G. F. (2008): Recombineering mycobacteria and their phages, in: Nature Reviews Microbiology 6 (11). 851–857.
- Wang, H. H./ Isaacs, F. J./ Carr, P. A./ Sun, Z. Z./ Xu, G./ Forest, C. R./ Church, G. M. (2009): Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution, in: Nature 460 (7257). 894–898.
- Way, J. C./ Collins, J. J./ Keasling, J. D./ Silver, P. A. (2014): Integrating biological redesign: Where synthetic biology came from and where it needs to go, in: Cell 157 (1). 151–161.
- Yan, W./ Smith, C./ Cheng, L. (2013): Expanded activity of dimer nucleases by combining ZFN and TALEN for genome editing, in: Scientific Reports 3, 1–6.