

## Jan Best und Ahmet Mert

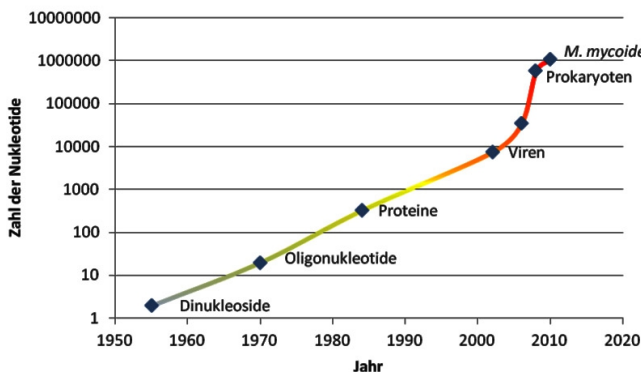
Sehnen Sie sich nach einem geeigneten Haustier und waren bisher ergebnislos auf der Suche? Dann sind Sie bei uns an der richtigen Adresse. Designen Sie sich einfach Ihr eigenes Haustier. Mit Ihrer Vorstellungskraft und unserer Technik sind keine Grenzen mehr gesetzt. Sie sehnen sich nach einem sprechenden Fisch oder einem fliegenden Hund? Durch unsere technisch-wissenschaftlichen Entwicklungen stellt dies kein Problem mehr dar...

So könnte in Zukunft die Anzeige in einer Tageszeitung aussehen. Doch so weit ist der wissenschaftliche und technische Fortschritt natürlich noch nicht. Schon seit jeher träumen die Menschen davon, Leben nach ihren Vorstellungen zu formen und zu erschaffen. Ähnlich wie das Monster in Mary Shelley's Roman Frankenstein wurde nun das Genom eines lebenden Organismus nach dem Baukastenprinzip aus vielen kleinen Untereinheiten (Oligonukleotide) zusammengesetzt. So ist es Wissenschaftlern um den US-Amerikaner J. Craig Venter und Nobelpreisträger Hamilton Othanel Smith erstmals gelungen, ein bekanntes Genom chemisch zu synthetisieren, das Genom in ein genomfreies Bakterium einzuschleusen und dieses zur Zellteilung zu bringen.[1]

Für diese Entwicklung wurde in den 1950er Jahren der Grundstein gelegt. 1955 ist es A. M. Michelson und Alexander R. Todd erstmals gelungen, ein Dinukleosid aus 2 Thymidinen herzustellen.[2] Thymidin ist die Verbindung aus der Pyrimidin-Nukleobase Thymin und einem Zucker (Desoxyribose) und ist ein Bestandteil der DNA. In den 1970er Jahren war man bereits in der Lage, Oligonukleotide mit einer Länge von 20 Nukleotiden zusammenzubauen. Im Jahre 1984 gelang es, Gene mit einer Länge von mehreren hundert Nukleotiden zu synthetisieren. Ein Team um Steven Brenner bastelte das erste Gen zusammen, welches die Bauanleitung für ein Eiweiß enthielt und eine Länge von 330 Nukleotiden besaß. 2002 beschrieben Jeronimo Cello und Eckard Wimmer erstmals die chemische Synthese eines Virus.[3] Dabei handelte es sich um ein Polio-Virus, welches beim Mensch für die Kinderlähmung (Poliomyelitis) verantwortlich ist. Ende 2006 war es schon möglich, synthetische DNA bis zu einer Größe von 35.000 Basenpaaren herzustellen.[4] 2008 gelang Craig Venter und seinem Team erstmals die Synthese des vollständigen Genoms eines Organismus, dem Bakterium *Mycoplasma genitalium* mit einer Größe von 580.000 Nukleotiden.[5] Zwei Jahre später konnte sogar das fast doppelt so große Genom von *Mycoplasma mycoides* chemisch synthetisiert werden (Abb. 1). Ob und wann ganze Genome von komplexeren, höheren Organismen synthetisiert werden können, ist noch nicht abzuschätzen. Sie sind wesentlich größer als bakterielle Genome und komplizierter aufgebaut. Sie bestehen aus unterschiedlichen Chromosomen und enthalten neben den für die Proteinbiosynthese wichtigen kodierenden Abschnitten (Exons) auch nicht kodierende Regionen (Introns).

Bei der Schaffung von künstlichem Erbmaterial gibt es grundsätzlich zwei Vorgehensweisen. Zum einen wird die „Top-down“-Methode verwendet, bei der neu geschaffene Gensequenzen in das Genom einer Zelle eingefügt werden und somit die genetische Ausstattung der Zelle verändert wird. Man übernimmt die funktionsfähigen Teile der Zelle und frisiert sie sozusagen nach eigenen Vorstellungen um. Bei der „Bottom-up“-

## Herstellung synthetischer DNA



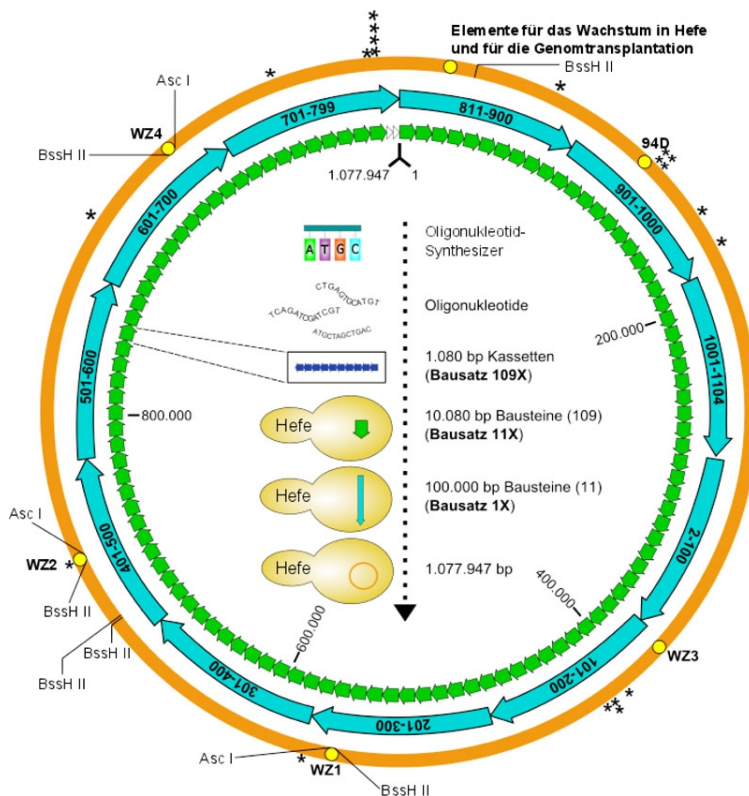
**Abbildung 1:** Die Abbildung zeigt eine Zeitlinie der Herstellung synthetischer DNA. Dabei ist die Anzahl der Nukleotide logarithmisch gegen das entsprechende Jahr und dessen Entwicklungsstand dargestellt. In immer kürzeren Abständen sind enorme Steigerungen der Syntheseleistung zu erkennen.

Methode beginnt man mit kleinsten Genabschnitten aus wenigen Nukleotiden und setzt diese zu immer komplexeren Sequenzen zusammen. Diese sogenannten „BioBricks“ gibt es in verschiedenen Komplexitätsstufen. Sie erfüllen unterschiedliche Funktionen.[6] „Parts“ sind für die grundlegende biologische Funktion zuständig, „Devices“ erfüllen eine vom Designer gewünschte Funktion und „Systems“ bewältigen komplexere Aufgaben.

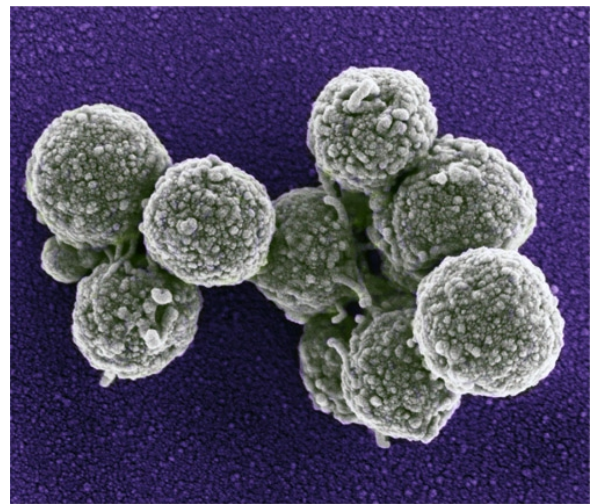
Von Venter und Mitarbeitern wurde das bekannte Genom des Bakteriums *Mycoplasma mycoides* von Grund auf aus kleinsten Bausteinen, sogenannten Oligonukleotiden aufgebaut (Abb. 2). Um den Wildtyp und das synthetische Genom unterscheiden zu können, wurden in das künstliche Genom zusätzlich 4 sogenannte

Wasserzeichen (WZ) eingefügt. Diese haben keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zelle. Sie kodieren allerdings eindeutige Identifizierungsmerkmale mit denen sich nachweisen lässt, ob man einen Organismus mit künstlichem Genom vor sich hat. Das gesamte Genom wurde dabei als zentromeres Plasmid in Hefezellen zusammengebaut. Im ersten Schritt wurden die Oligonukleotide zu 1078 DNA-Kassetten zusammengefügt, welche jeweils 1080 Basenpaare enthielten. Die Kassetten wurden so entworfen, dass 80 Basenpaare große Überschneidungen zu angrenzenden Kassetten bestehen. An den Enden der Kassetten befinden sich dabei Sequenzabschnitte, die von Enzymen, in diesem Fall der Restriktionsendonuklease NotI erkannt werden. Diese werden an diesen Stellen genau so beschnitten, dass die resultierenden DNA-Fragmente zusammengeführt und zu immer längeren DNA-Abschnitten assembliert werden können. Auf diese Weise wurden in Hefezellen 109 Baugruppen erzeugt, welche jeweils aus 10.080 Basenpaaren bestanden. Die erhaltenen Bausteine wurden erneut in Hefezellen überführt und zu insgesamt 11 aus 100.000 Basenpaaren bestehenden Fragmenten zusammengesetzt. Pro 400 ml Hefekultur, was etwa  $10^{11}$  Zellen entspricht, wurde ca. 1 µg jedes Fragments produziert. Die noch zirkulären Fragmente wurden durch NotI gepalten und wiederum in Hefezellen gebracht. In dieser finalen Phase wurden die 11 Fragmente zum fertigen Genom zusammengebaut. Um zu überprüfen, ob das gesamte Genom zusammengebaut wurde, wurde die intakte DNA aus den Hefezellen isoliert und mit 2 verschiedenen Restriktionsenzymen (*Ascl* und *BssHII*) gespalten. Da in drei der vier Wasserzeichenregionen Erkennungssequenzen für diese Enzyme vorhanden sind, nicht aber im natürlichen Genom von *Mycoplasma*, war es anhand der neu hergestellten DNA-Buchstücke möglich, zu verifizieren, dass es sich bei der in der Hefe hergestellten DNA tatsächlich um das künstliche Genom handelte.

Das fertige *M. mycoides* Genom wurde abschließend in eine von eigenem Erbmateriale befreite *M. capricolum*-Zelle transplantiert. Da das künstliche Genom in Hefezellen zusammengebaut wurde, enthielt es nicht den natürlichen Schutz vor dem eigenen Restriktionssystem, welches sich *M. mycoides* und *M. capricolum* teilen. Damit das Genom in den Empfängerzellen nicht zerschnitten wurde, wurde die DNA entweder mit Methylasen methyliert oder das Restriktionssystem der Empfängerzelle zerstört. Die nun entstandene „künstliche“ Zelle war selbstreplizierend und zu exponentiellem Wachstum befähigt. Die Zellen verhielten sich wie eine *M. mycoides*-Zelle und nicht wie die ursprüngliche *M. capricolum*-Zelle. Nach über 30 Teilungen der ersten künstlichen Zelle



**Abbildung 2:** Schematischer Zusammenbau des synthetischen *M. mycooides* Genoms in Hefe. Die chemisch synthetisierten Oligonukleotide wurden zunächst zu 1078 überschneidenden DNA-Kassetten zusammengesetzt (blaue Pfeile). Die aus 1080 Basenpaaren (bp) bestehenden Kassetten wurden jeweils in Zehnerpaaren zu 109 ~10-kbp Fragmente kombiniert (grüne Pfeile). Davon wurden erneut 10 Fragmente zu 11 ~100 kbp Bausteinen zusammengebaut (türkisene Pfeile). Im letzten Schritt wurden die 100 kbp großen Fragmente zum vollständigen Genom zusammengesetzt (oranger Kreis). Abgesehen von 2 Gebilden (weiße Pfeile), welche in vitro enzymatisch zusammengesetzt wurden, wurden alle Baugruppen in vivo hergestellt. Größere Unterschiede zum natürlichen Genom sind als gelbe Kreise gekennzeichnet. Diese beinhalten 4 Wasserzeichenregionen (WZ1 bis WZ4), eine 4-kbp große Region, welche absichtlich entfernt wurde (94D) und verschiedene Elemente für das Wachstum in Hefe und für die Genomtransplantation. Darüber hinaus sind 20 Stellen mit Nukleotidpolymorphismen durch Sterne gekennzeichnet. Die designte Sequenz besteht aus 1.077.947 bp. Die Restriktionsstellen von Asc I und BssH II sind markiert. Die Kassetten 1 und 800-810 waren nicht von Bedeutung und wurden daher entfernt. Dementsprechend gab es Überschneidungen zwischen Kasette 2 und 1104, sowie 799 und 811 (Abb. Nach Referenz [5]).



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *M. mycooides* JCVI syn1.0. Das Bild wurde mit einem hochauflösenden Elektronenmikroskop (Merlin) der Firma Zeiss aufgenommen. Jede Zelle besitzt einen Durchmesser von ca. 0,5 µm. Die Aufnahme wurde zur Verfügung gestellt von Thomas Deerinck und Mark Ellisman, NCMIR, UCSD.

enthält die Nachkommenschaft (Abb. 3) keine Proteine der Empfängerzelle mehr. Das beweist, dass tatsächlich das Genom für die Eigenschaften eines Organismus verantwortlich ist und nicht restliches Zellmaterial, wie beispielsweise Proteine oder Ribosomen.

Rückblickend kann man feststellen, dass hier kein künstliches Leben erschaffen wurde, sondern bereits vorhandenes manipuliert wurde. Es wurde lediglich eine bereits bekannte DNA synthetisiert, zusammengesetzt und diese in eine genomfreie Zelle gebracht. Zu einem vollständig künstlichen und lebenden Organismus gehört einiges mehr, als die genomische DNA. Nicht umsonst werden Viren nicht zu den Lebewesen gezählt.

Sie bestehen lediglich aus ihrem Genom und einer Proteinhülle und sind selbstständig nicht teilungsfähig und daher auf einen Wirtsorganismus angewiesen. Eine lebens- und teilungsfähige Zelle benötigt zusätzliche Komponenten wie zum Beispiel eine Cytoplasmamembran, Ribosomen und Proteine. Bei Eukaryoten, zu denen der Mensch gehört, wird es mit ganzen Zellorganellen noch um einiges komplizierter. Trotzdem ist die geglückte Neuausstattung einer lebenden Bakterienzelle mit einem Genom ein wissenschaftliches Novum und eine technische Meisterleistung und lässt gespannt in die Zukunft blicken.

## Kontakt:



Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. [Woche 2](#)). Die Autoren, Jan Best und Ahmet Mert, sind Studierende des Fachs Biologie an der TU Darmstadt

(E-Mails: [jan\\_best@yahoo.de](mailto:jan_best@yahoo.de), [ahmet.mert@stud.tu-darmstadt.de](mailto:ahmet.mert@stud.tu-darmstadt.de)).



Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Harald Kolmar

(E-Mail: [kolmar@biochemie.tu-darmstadt.de](mailto:kolmar@biochemie.tu-darmstadt.de)).

## Schlauer Fuchs

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Welche beiden Methoden werden angewandt, um künstliches Erbmaterial zu schaffen?

## Literatur:

[1] Gibson, D. G., J. I. Glass, et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**: 52-56.

[2] Michelson, A. M., A.R. Todd (1955). Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* 2632-2638.

[3] Jeronimo Cello, e. a. (2002). Chemical Synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template. *Science* **297**: 1016.

[4] [http://www.forbes.com/2006/07/12/dna-artificial-genes-codon-cz\\_mh\\_0713codon.html](http://www.forbes.com/2006/07/12/dna-artificial-genes-codon-cz_mh_0713codon.html)

[5] Gibson, D. G., G. A. Benders, et al. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* **319**: 1215-1220.

[6] Jha, A. (2005). From the cells up. *The Guardian*.  
<http://www.guardian.co.uk/science/2005/mar/10/science.research>