Synthetische Biologie

Copy, paste, repeat – über die Synthese von Minimalzellen

LAURA I. WEISE, KAI LIBICHER, HANNES MUTSCHLER
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED

The creation of self-replicating minimal cells is a major goal in synthetic biology and origin of life research. In order to be considered alive, a minimal cell must have several characteristics such as the ability to reproduce and adapt to its environment. Our research focuses on genetic replication and evolution in such minimal systems.

DOI: 10.1007/s12268-018-0927-4
© Die Autoren

■ Das Phänomen Leben ist auf der Erde allgegenwärtig; es umgibt uns in bemerkenswerter Vielfalt von einfachen Mikroben bis hin zu komplexen Mehrzellern wie uns selbst. Doch was genau ist Leben überhaupt? Wie ist es einst aus unbelebter Materie entstanden, und können wir es auch selbst im Reagenzglas erzeugen? Diese sehr zentralen und herausfordernden Fragen sind sowohl theoretisch als auch experimentell Gegenstand der Synthetischen Biologie und der *Origin-of-Life*-Forschung. Da die kleinste Einheit allen bekannten Lebens die Zelle ist, konzentrieren sich viele der intradisziplinären Forschungsbemühungen auf die Frage, ob und wie es möglich ist, minimale Zellen mit lebensähnlichen Eigenschaften *de novo* zu erschaffen.

Die Synthese einfacher, aber gleichzeitig auf spezifische Aufgaben zugeschnittener Zellen verspricht Zugang zu bisher ungeahnten biotechnologischen und medizinischen Anwendungen. Weiterhin würde uns die Identifikation der Minimalausstattung lebendiger Zellen ein tieferes Verständnis über die Entstehung des Lebens auf der Erde ermöglichen.

Essenzielle Eigenschaften und Bestandteile einer Zelle

Die erstaunliche Komplexität biologischer Systeme basiert auf einer seit ungefähr vier Milliarden Jahren andauernden, graduellen evolutionären Optimierung. Trotzdem ist davon auszugehen, dass zelluläres Leben in seinen grundlegenden Eigenschaften auch in einfacheren, vorhersagbaren Systemen implementiert und unterhalten werden kann [1]. Diese angestrebte *de novo*-Entwicklung von einfachen Zellen erfordert aber zunächst ein genaues Verständnis der essenziellen Eigenschaften und Bestandteile lebendiger Systeme.

Grundsätzlich muss jede lebende Zelle drei Fähigkeiten besitzen: Selbsterhaltung, Reproduktion und Adaption [2]. Sie sind für den Fortbestand und die fortwährende Anpassung in einer sich verändernden Umwelt unerlässlich und basieren auf drei Grundbausteinen (Abb. 1). Notwendig für die Reproduktion und Adaption ist ein genetisches Informationsverarbeitungssystem, das einen wandelbaren zellulären Bauplan speichert und repliziert. Für die

Selbsterhaltung einer Zelle ist weiterhin eine physikalische Abgrenzung zur Umgebung notwendig: Die Einkapselung eines Reaktionsraumes in eine spezifische Mikroumgebung erlaubt, dass biochemische Reaktionen ohne den Verlust einzelner Komponenten geschützt und reguliert ablaufen können, und garantiert damit eine zeitlich-räumliche Kopplung zwischen einem Genom und seinen Produkten. Daher ist es notwendig, auch minimale künstliche Zellen mit einem oder mehreren Kompartimenten zu versehen. Weiterhin betrachten auch viele Forscher das Vorhandensein von Homöostase, also der Aufrechterhaltung und Regulation eines inneren Gleichgewichtszustandes durch metabolische Prozesse, als essenzielle Fähigkeit eines jeden Lebewesens. Für die Konstruktion erster Prototypen minimaler Zellen erscheint es aber zunächst legitim, das Fehlen eines komplexen Metabolismus durch die externe Zugabe wichtiger Bausteine experimentell zu überbrücken.

Unsere Arbeitsgruppe konzentriert sich daher gegenwärtig auf die Entwicklung und Charakterisierung künstlicher, zur Replikation und Evolution fähiger genetischer Systeme für Minimalzellen. Mit Hinblick auf plausible *Origin-of-Life*-Szenarien untersuchen wir weiterhin, wie deren Reproduktion ohne die ausgeklügelte Proteinmaschinerie moderner Zellen funktioniert haben könnte.

Protozellen als Modell für die Entstehung des Lebens

Aufgrund fehlender fossiler Belege aus der Geburtsstunde des Lebens ist es nicht möglich, die Entstehung der ersten Zellen exakt nachzuvollziehen. Die *Origin-of-Life*-Forschung versucht daher, die Eignung plausibler chemischer und geologischer Szenarien mit Hin-

► **Abb. 1:** Die Grundbausteine einer minimalen Zelle sind ein sich replizierender genetischer Informationsspeicher, ein Metabolismus, um die erforderliche Energie und Bausteine zur dauerhaften Selbsterhaltung zur Verfügung zu stellen, und ein Kompartiment, das als Schutz und Abgrenzung der zellulären Mikroumgebung dient.

blick auf die Biogenese primitiven Lebens aus einfachen Bausteinen zu überprüfen. Im experimentellen Fokus steht hierbei die Rekonstruktion von „Protozellen“ als Vorstufen komplexen Lebens.

Eine der klassischen Hypothesen über den Ursprung des Lebens ist die RNA-Welt-Hypothese [3]. Nach dieser konnten Protozellen die Nukleinsäure RNA sowohl als Katalysator (Ribozym) als auch für die Speicherung der Erbinformation verwenden. Erst mit der Evolution der Proteinsynthese durch Ribosomen, den komplexesten bekannten Ribozymen, und der Fähigkeit, große Informationsmengen auf DNA-Ebene zu speichern, wurde die Entwicklung moderner Zellen eingeleitet. Vermutlich war dabei RNA auf ihrem evolutionären Werdegang von Beginn an nie alleine, sondern von vornherein auf eine molekulare Kooperation mit einfachen Peptiden, Fettsäuren und anderen Biomolekülen angewiesen. Darauf deuten auch die jüngsten Ergebnisse aus dem Feld der präbiotischen Chemie hin, die einen gemeinsamen chemischen Ursprung aller Bausteine des Lebens nahelegen [4].

In unserer eigenen Forschung untersuchen wir, inwieweit es möglich ist, robuste Protozellen mit RNA-basierten genetischen Systemen zu erzeugen, die auch ohne Proteine zur Proliferation fähig sind. Es wird beispielsweise vermutet, dass periodische Umweltveränderungen, wie Temperaturzyklen, eine wichtige Rolle beim Entstehen des Lebens gespielt haben. So gewährt das wiederholte Einfrieren und Auftauen einfachster Ribozyme diesen einen beachtlichen Aktivitätsschub [5], der sich vermutlich zum Aufbau selbstreplizierender RNA-Systeme nutzen lässt. Gleichzeitig können einfache Membranvesikel – als mögliche Hülle von Protozellen – mithilfe solcher Frost-Tau-Zyklen Bausteine aus ihrer Umgebung aufnehmen, aber auch ihren Inhalt mit anderen Vesikeln austauschen, ohne zerstört zu werden [6]. Daraus lässt sich ein attraktives Szenario für die Entstehung, aber auch die Vermehrung erster einfacher Protozellen ableiten und zukünftig experimentell überprüfen (Abb. 2). So könnten periodische Änderungen von Umweltbedingungen erklären, wie Ribozyme ursprünglich in Protozellen „verpackt“ wurden. Des

Weiteren bieten sie eine mögliche Erklärung, wie RNA-Replikatoren sich ohne komplexe Zellteilungsmechanismen innerhalb von Vesikelpopulationen verbreiten konnten.

In komplementären Szenarien überprüfen wir zusammen mit unseren Kollaborationspartnern, ob ribozymbasierte Protozellen sich auch aus komplett membranfreien Kompartimenten, den Koazervaten, bilden können. Koazervate sind kugelförmige Molekülaggregate, die sich durch elektrostatische Assoziation von entgegengesetzt geladenen Makroionen bilden und schon lange mit dem Ursprung des Lebens in Verbindung gebracht werden [7]. Kürzlich konnten wir zusammen mit zwei anderen Forschungsgruppen tatsächlich nachweisen, dass Ribozyme spontan von Koazervaten aufgenommen werden, sich in ihnen konzentrieren und dort auch katalytisch aktiv sind [8].

Translationsgekoppelte Replikatoren

Wenn man sich weniger auf die präbiotische Plausibilität konzentriert und mehr auf das Ziel, überhaupt eine minimale lebende Zelle aus unbelebten Komponenten zu erschaffen, können existierende Enzyme verwendet werden. Die Verwendung dieser, den Ribozymen katalytisch weit überlegenen, Werkzeuge hat allerdings ihren Preis: Sie erfordert die Integration des Translationsapparats – einer komplexen Maschinerie, die durch mehr als 100 Gene codiert wird. Da gegenwärtig die komplette Codierung und Selbstsynthese aller an der Translation und Ribosomenbiogenese beteiligten Komponenten außerhalb natürlicher Zellen noch nicht möglich ist, bleibt die Konstruktion einer sich replizierenden Minimalzelle weiterhin sehr anspruchsvoll [9]. Eine der vielen Herausforderungen hierbei ist das Fehlen geeigneter minimaler Genome, die sich *in vitro* replizieren und alle für die Proteinexpression und Replikation benötigten Komponenten speichern können.

Das macht es nötig, sich zunächst der Entwicklung robuster, aber nicht komplett autarker „Autoreplikatoren“ zu widmen. In unserem Fall sind das zur Vervielfältigung ihres eigenen genetischen Materials fähige Replikationsproteine (beispielsweise virale Replikasekomplexe), die für ihre Synthese allerdings externe Hilfe benötigen – durch von außen zugeführte Translationssysteme. Selbst die Erstellung solcher rekursiver, *in vitro*-translationsgekoppelter Replikatoren ist jedoch nicht trivial, und die wiederholte, proteinbasierte Autoreplikation gelang bisher nur für äußerst simple Genome [10, 11]. Wir erpro-

▲ **Abb. 4:** Visualisierung der Autoreplikation von DNA in Wasser-in-Öl-Emulsions-tröpfchen (200-fache Vergrößerung). Die DNA in den zellartigen Kompartimenten wurde durch einen grünen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht.

ben daher eine Kombination aus computer-gestütztem Genomdesign und kompartmentierter *in vitro*-Evolution, um unter anderem auch mithilfe der Mikrofluidik effiziente sowohl auf RNA als auch auf DNA basierende, erweiterbare Systeme zu erzeugen (**Abb. 3** und **4**). Durch diesen Ansatz sollen die Replikatoren Schritt für Schritt immer komplexere genetische Frachten mitreplizieren können und somit inkrementell ihre Autonomie erhöhen – beispielsweise durch das genetische Codieren von Teilen der Translationsmaschinerie oder einfachen Stoffwechselwegen. Obwohl es noch eine Vielzahl an Aufgaben zu bewältigen gibt, sind wir zuversichtlich, dass unsere Forschung einen maßgeblichen Beitrag zur Erschaffung einer „lebendigen“ Zelle leisten wird.

Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung unserer Projekte durch die VolkswagenStiftung und das MaxSynBio-Konsortium, das gemeinsam vom Bundesministerium für Bildung und Forschung und der Max-Planck-Gesellschaft gefördert wird. ■

Literatur

- [1] Schwille P, Spatz J, Landfester K et al. (2018) MaxSynBio – Avenues towards creating cells from the bottom up. *Angew Chem Int Ed Engl*, doi: 10.1002/anie.201802288
- [2] Luisi PL, Ferri F, Stano P (2006) Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften* 93:1–13
- [3] Higgs PG, Lehman N (2015) The RNA world: molecular cooperation at the origins of life. *Nat Rev Genet* 16:7–17
- [4] Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ et al. (2015) Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat Chem* 7:301–307
- [5] Mutschler H, Wochner A, Holliger P (2015) Freeze-thaw cycles as drivers of complex ribozyme assembly. *Nat Chem* 7:502–508
- [6] Litschel T, Ganzinger KA, Movinkel T et al. (2018) Freeze-thaw cycles induce content exchange between model protocells. *New J Phys* 20:055008

- [7] Oparin AI (1965) The origin of life and the origin of enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 27:347–380
- [8] Drobot B, Iglesias-Artola JM, Le Vay K et al. (2018) Compartmentalized RNA catalysis in membrane-free coacervate protocells. *bioRxiv*, doi: 10.1101/273417
- [9] Jewett MC, Forster AC (2010) Update on designing and building minimal cells. *Curr Opin Biotechnol* 21:697–703
- [10] Ichihashi N, Usui K, Kazuta Y et al. (2013) Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat Commun* 4:2494
- [11] van Nies P, Westerlaken I, Blanken D et al. (2018) Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nat Commun* 9:1583

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. Open access funding provided by Max Planck Society.

Korrespondenzadresse:

Dr. Hannes Mutschler
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18
D-82152 Martinsried
Tel.: 089-8578-3420
mutschler@biochem.mpg.de

AUTOREN

Laura I. Weise

2011–2014 Bachelorstudium Chemie und Biochemie und 2014–2017 Masterstudium Biochemie an der LMU München. Seit 2017 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Kai Libicher

2011–2014 Bachelor- und 2014–2017 Masterstudium der Molekularen Biotechnologie an der TU München. Seit 2017 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, über das Graduiertenprogramm der International-Max-Planck-Research-School (IMPRS).

Hannes Mutschler

2001–2006 Biophysikstudium an der HU Berlin und der ETH Zürich, Schweiz. 2007–2011 Promotion am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg. 2012–2016 Postdoktorand am MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. Seit 2016 unabhängiger Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.