

# Synthetische Biologie: Immenser Fortschritt in der Signalling-Forschung

Dr. Tilman Brummer, BIOS; Raphael Gübeli, SGBM; Prof. Dr. Wilfried Weber, BIOS Freiburg

Obwohl sich die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen zur Synthetischen Biologie derzeit alle 20 Monate verdoppelt, haben die meisten Europäer (durchschnittlich 83 %) laut der jüngsten Eurobarometer-Umfrage noch nie von dem dynamischen Forschungsgebiet gehört. Zugleich dokumentiert die repräsentative EU-Umfrage zur Biotechnologie, dass sich die Deutschen besonders für die Chancen und Anwendungen des Neudesigns biologischer Systeme interessieren: 62% fragen zuallererst nach dem Nutzen von synthetischen Bakterien mit neuartigen Eigenschaften, zellulären Schaltern oder genetischen Regelkreisen – gut 10% mehr als im EU-Durchschnitt. Erst dann wollen sie mehr über die potentiellen Risiken erfahren. Aufklärung über den aktuellen Stand der Forschung bot Ende September 2010 das erstmals ausgerichtete internationale Symposium „Signalling meets Synthetic Biology“. Auf der vom Freiburger Cluster BIOS (Centre for Biological Signalling Studies) organisierten und mit 230 Wissenschaftlern gut besuchten Konferenz wurde klar: Vom Design vollständig künstlicher Mikroorganismen sind die Forscher trotz anderslautender Medienberichte noch Jahre entfernt. Doch auf einem anderen Gebiet berichten verschiedene Gruppen bereits von Fortschritten und ersten Anwendungen – der gezielte Eingriff in die Zellkommunikation durch das Neudesign zellulärer Schalter, Signalwege und Regelkreise eröffnet die Möglichkeit, Krankheitsmechanismen und deren Modulation nachzustellen und so das Drug Discovery zu verbessern. Diese Signalforschungs-orientierte Synthetische Biologie hatten die Organisatoren um BIOS-Direktor Michael Reth getreu dem Leitmotto „From Analysis to Synthesis“ in das Zentrum des zweitägigen Symposiums gestellt.

Während das gesamtgenomische Engineering ganzer Mikroorganismen laut Drew Andy (Stanford University) „erst in sechs bis zehn Jahren“ möglich sein wird, wenn verbesserte Methoden der DNA-Synthese, mehr standardisierte biologische Teile (BioBricks) und interne Referenzgrößen zur Verfügung stehen, zeigt sich bereits zunehmend der Nutzen des synthetischen Nachbaus minimaler definierter biologischer

Systeme. Durch *in vitro* rekonstruierte Systeme lassen sich fundamentale biologische Prozesse immer besser quantitativ beschreiben und modellieren, erläuterte Petra Schwille (TU Dresden) in ihrem Vortrag. Als Beispiel nannte die Leibniz-Preisträgerin die Rekonstruktion der Zellteilung von *E. coli* mittels eines *in vitro*-Assays. Mit Hilfe der zwei Proteine MinD und MinE, einer Membran und einer Energiequelle gelang es,

die Mechanismen der Selbstorganisation aufzuklären, die dazu führen, dass sich die Mutterzelle symmetrisch in zwei Tochterzellen teilt.

## Synthetische Schalter

Wieviel Anwendungspotential im Design und der Konstruktion von neuartigen synthetischen Schaltmechanismen und Regelkreisen liegt, zeigte sich in den Arbeiten, die Jeff Tabor (Rice University Houston), Christina Smolke (Stanford University), Martin Fussenegger (ETH Zürich) und Wilfried Weber (Universität Freiburg) in Freiburg vorstellten.

Martin Fussenegger berichtete über die erstmalige Anwendung eines synthetischen Regelkreises mit medizinischem Nutzen in Säugetieren. Dazu hatte der Forscher genetische Schaltkreise in gichtkranke Mäuse implantiert, die ein engineered bakterielles Regulationssystem kodieren, das die zu hohen Harnsäurekonzentrationen im Blut der Nager erkennt, daraufhin das Enzym Uratoxidase exprimiert und so die Konzentration des gichtinduzierenden Metaboliten auf physiologische Blutkonzentrationen senkt. Das patentierte Prinzip, pathologisch hohe Konzentrationen von Metaboliten mit Hilfe des Transkriptionsrepressor/-Operatorpaars HucR/hucO und nachgeschalteten katabolen Enzymen zu regulieren, sieht Fussenegger als Weiterentwicklung der Gentherapie.

Einen medizinisch vielversprechenden Ansatz präsentierte Christina Smolke auf dem BIOS-Meeting: modular aufgebaute Riboschalter, die aus drei Teilen bestehen – einer Sensor-RNA, an die Medikamente oder von kranken Zellen überexprimierte Moleküle binden, einer RNA, die daraufhin ihre Konformation ändert (oder differentiell gespleißt wird) und dadurch eine Effektor-RNA freigibt, die gewünschte Zellantworten induziert. Mit dieser Strategie gelang es Smolke bereits, die Vermehrung primärer T-Zellen und damit die Immunantwort in Mäusen abhängig von der Konzentration eines externen Liganden zu kontrollieren. Ein großer Schritt auf dem Weg, die endogenen, von Krebszellen bevorzugt gebildeten Proteine zu deren Wachstumsarrest und Vernichtung zu nutzen, ist Smolke ebenfalls geglückt. Ein Aptamer, das erstmals die Expression eines Suizidgens mit der Anwesenheit der endogenen Proteine  $\beta$ -Catenin und NF $\kappa$ B verknüpft, stellte Smolke unlängst vor.

Jeff Tabor präsentierte lichtgesteuerte Signalelemente in *E. coli*, die als Edge-Detektor die Grenze zwischen Hell und Dunkel erkennen oder die es erlauben, abhängig von der eingestrahlten Lichtfarbe ortsspezifisch und differentiell die Expression einzelner Gene zu aktivieren.

Synthetische Schaltkreise halfen laut Wilfried Weber, der 2008 gemeinsam mit Martin Fussenegger die Firma BioVersys gegründet hatte, auch einen neuen Wirkstoff zu entdecken, der die Resistenz des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* gegenüber dem Antibiotikum Ethionamid aufhebt. Das Scree-

## Laborwelt Hintergrund

### BIOS – Centre for Biological Signalling Studies

In dem im Herbst 2007 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft bewilligten Exzellenzcluster BIOS arbeiten derzeit die Labors von 34 Professoren und weiter 30 assoziierte Labors. Neben der Analyse und dem Nachbau bzw. Design biologischer Signalprozesse schreibt das Freiburger Cluster die Nachwuchs- und Frauenförderung groß. Dafür sorgen u.a. eine enge Zusammenarbeit mit der Spemann-Graduiertenschule für Biologie und Medizin (SGBM) sowie eine paritätische Besetzung der W3-Professuren mit Frauen und Männern. Neben der Ausbildung junger Bioingenieure stehen Interdisziplinarität und Öffentlichkeitsarbeit weit oben auf der BIOS-Agenda.





Abb. 1: BIOS's intern (v. links): Rektor Hans-Jochen Schiewer, der wissenschaftliche BIOS-Direktor Michael Reth und Wilfried Weber

ning einer Molekülbibliothek gegen ein *in vitro*-System, das die Bindung des von resistenten Bakterien gebildeten Repressors (EthR) an einen Operator nachstellt, der die Expression der Ethionamid-spaltenden Flavinmonooxygenase EtaA reguliert, lieferte den präklinischen Arzneimittelkandidaten BV6481.

### Künstliche Stammzellnischen

Wie über synthetische extrazelluläre Matrices das Wachstum und die Differenzierung von Stammzellen gesteuert werden können, berichteten Helen Blau (Stanford University), Prasad Shastri (Universität Freiburg), Matthias Lutolf (EPFL Lausanne) sowie Noortje Kornet aus der Arbeitsgruppe Thomas Laux (Universität Freiburg). Während Noortje Kornet die Funktion und Bedeutung der natürlichen Stammzellnische für die Entwicklung von *Arabidopsis* darstellte,

beschrieben Shastri, Blau und Lutolf Ansätze, wie sich über synthetische Nischen die Zellfunktion steuern lässt.

Shastri stellte in diesem Zusammenhang eine Methode zur *in vivo*-Knorpelregeneration in einer Alginate-Matrix dar, die ohne Transplantation auskommt. Nach Shastri's Ergebnissen spielen die physiko-chemischen Eigenschaften der zur Differenzierung pluripotenter Stammzellen und Geweberegeneration eingesetzten Biomaterialien *in vivo* auf noch unverstandene Weise eine viel größere Rolle als die zur *in vitro*-Differenzierung vielgenutzten Wachstumsfaktoren.

Helen Blau berichtete, dass sich durch eine künstliche Stammzellnische, die in Zellkultur schnell schwindende Regenerationsfähigkeit adulter gewebespezifischer Stammzellen aber auch *in vitro* aufrechterhalten lässt. Durch Einsatz eines elastischen Hydrogel-Substrats sowie von extrazellulären Nischenfaktoren gelang es ihrer Gruppe, Muskelstammzellen

zu kultivieren, die in Kultur nicht ihre Regenerationsfähigkeit einbüßen, ein in Kultur bisher stets auftretendes Problem. Nach Transplantation in Mäuse wies Blau mit automatisierten bilderkennenden Verfahren nach, dass die Zellen sich selbst erneuerten und signifikant zur Muskelregeneration beitrugen. Dies stützt die These, dass sich die Entwicklung von Stammzellen auch mit Hilfe geeigneter Biomaterialien steuern lässt.

Matthias Lutolf zeigte auf, wie durch den Einsatz von Mikrosystemtechnik und automatisierter Einzellzellanalyse Stammzellen im Hochdurchsatzverfahren kultiviert und charakterisiert werden können mit dem Ziel, optimale Kultivationsbedingungen für adulte Stammzellen zu entwickeln.

### Analyse von Signalwegen

Vor der gezielten Manipulation krankheitsrelevanter Signalketten steht naturgemäß deren Analyse und die Identifikation geeigneter Subsysteme für das Rebuilding. Denn die Dynamik der komplexen Signalprozesse ist bisher weitgehend unverstanden. Entsprechende Vorträge nahmen einen großen Raum des Symposiums ein. Chris Marshall (Institute of Cancer Research, London), Walter Kolch (University College Dublin) und Tilman Brummer (Universität Freiburg) stellten in ihren Präsentationen neueste Ergebnisse zu MAPK-Signalwegen und kleinen G-Proteinen vor, die eine Rolle in der Tumorpherese bzw. Zellmigration spielen. MAPK-Signalwege stellen die ersten Signalwege in eukaryotischen Zellen dar, deren Grundkomponenten und hierarchische Ordnung aufgeklärt wurde. Aufgrund des guten Verständnisses dieser Signalwege werden sie bereits zur mathematischen Modellierung

# DASGIP Parallel Bioreactor Systems

- Enhance Cell Productivity
- Deliver Scalable Results
- Make Processes Reproducible

Parallel Bioreactor Systems for Unparalleled Results.



Europe  
+49 2461 9800  
info@dasgip.de

US West Coast  
+1 510 799 6105  
tombruggman@dianovainc.com

US East Coast  
+1 800 531 9462  
biotools@dasgip.com

www.DASGIP.com

DAS  
GIP  
TECHNOLOGY

herangezogen. Mit Hilfe von Proteomanalysen sowie der RNA-Interferenz wurden zudem neue Erkenntnisse zur Feinregulation der Effektorfunktionen dieser Signalwege sowie zur Rolle der kleinen G-Proteine bei der Zellmigration vorgestellt

Erst unlängst entdeckte, transient gebildete Strukturen auf der Zelloberfläche invasiver Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der physiologischen und pathologischen Zellwanderung, etwa der Metastasierung von Tumorzellen. Nachdem die Gruppe von Sara Courtneidge (Burnham Institute, La Jolla) bereits ein Protein (Tsk4) und Komponenten eines Pathways in glatten Muskelzellen (PDGF-Rezeptor, Src, p53 und die regulatorischen miRNAs miR143, miR145) identifiziert hatte, die zur Bildung dieser Podosomen und Invadopodien benötigt werden, stellte sie in Freiburg einen zellbasierten Assay vor, mit dem sich automatisiert Aktivatoren und Inhibitoren der Podosomen/Invadopodien-Bildung identifizieren lassen. Ziel der laufenden Forschungsarbeit ist es, genau zu verstehen, wie die identifizierten niedermolekularen Inhibitoren und siRNAs auf die Komponenten des Signalweges wirken, um diese modulieren zu können.

Yinon Ben-Neriah (Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem) präsentierte daneben neue genetische Ansätze, die einen besseren Einblick in das Wechselspiel zwischen Entzündungsprozessen und Tumorentwicklung

geben. Giulio Superti-Furga (CeMM, Wien) gab einen Überblick über die neuesten Erkenntnisse hinsichtlich des Multiproteinkomplexes, der von dem Treiber der chronisch-myeloischen Leukämie, dem Bcr-Abl-Onkoprotein, in Tumorzellen aufgebaut wird. Diese Proteomik-basierten Studien bilden möglicherweise die Basis für neue Therapie-Ansätze. Chris Meisinger (Freiburg) berichtete zudem, inwieweit zytoplasmatische Signalwege durch die Phosphorylierung von Proteinen diverse Prozesse in Mitochondrien steuern, während Klaus Palme (Freiburg) neue Erkenntnisse zu den Signal-Prozessen in der Entwicklung von Pflanzenwurzeln vortrug.

Eine Reihe weiterer Vorträge drehte sich um die Analyse der Signaltransduktion bei der Aktivierung von T- und B-Zellen. Doreen Cantrell (University of Dundee) stellte dar, wie sich mit einem Proteomik-Ansatz das von Serin/Threoninkinasen kontrollierte Signalnetzwerk in T-Lymphozyten untersuchen lässt, André Veillette (Clinical Research Institute, Montreal) berichtete über neueste Forschungsergebnisse zu Adaptorproteinen in T-Lymphozyten. Während Johannes Huppa (Stanford) und Wolfgang Schamel (Freiburg) über den Zusammenbau und die Funktion von T-Zell-Antigenrezeptoren vortrugen, berichtete Sebastian Herzog (Freiburg) über die delicate Balance zwischen Proliferation und Differenzierung in der frühen Entwicklung der B-Lymphozyten. Obgleich die

vorgestellten Feinanalysen des Immunsignalings auf den ersten Blick zunächst recht wenig mit der Synthetischen Biologie zu tun zu haben scheinen, legen sie wichtige Grundlagen für das künstliche Rebuilding definierter Teilsysteme der Immunfunktion, das überraschende und höchst praxisrelevante Ergebnisse bereit halten kann. Ein solches präsentierte BIOSS-Sprecher Michael Reth zwar nicht auf der Tagung, aber in einer zeitgleich zu dieser erschienenen Publikation (NATURE, 2010 Sep 23; 467(7314):465-9). Durch Zusammenbau und Funktionalisierung künstlicher B-Zellrezeptoren in *Drosophila* konnte er das bisherige Paradigma der Rezeptoraktivierung widerlegen: Die Antigenbindung an B-Zellrezeptoren führt, wie Reths Gruppe zeigen konnte, nicht zur Zusammenlagerung einzelner Rezeptoren in ruhenden Zellen, sondern zur Dissoziation von in ruhenden Zellen vorhandenen Rezeptoroligomeren. Bestätigt sich das neue Dissoziations-Aktivierungsmodell der Antikörperbildung, ergeben sich neue pharmakologische Angriffspunkte in ruhenden B-Zellen.

### Redesign von Signalwegen

Die bakterielle Chemotaxis ist einer der bestcharakterisiertesten Signalwege. Nachdem Victor Sourjik (Heidelberg) die direkte und indirekte Aktivierung der beteiligten Rezeptorproteine quantitativ erfasst hatte, zeigte er, wie das Wissen für ein Redesign des Chemotaxis-Pathways in *E. coli* im Sinne der synthetischen Biologie eingesetzt werden kann. Ziel der in zahlreichen Labors laufenden Versuche, die Spezifität und den Output des Signalweges zu modifizieren, ist die Entwicklung neuer Biosensoren.

Wie sich Komponenten prokaryotischer und eukaryotischer Signalketten in Pflanzen zu synthetischen Biosensoren mit verändertem Output sowie Aktivierungssignalen vernetzen (rewire) lassen, demonstrierte June Medford (Colorado State University) in einem eindrucksvollen Vortrag. Dabei machte sich die Forscherin zunutze, dass die Komponenten von Histidinkinase (HK)-Transduktionssystemen sowohl in Bakterien, Hefen als auch Pflanzen hochkonserviert, modular aufgebaut und damit prinzipiell gegenseitig durch Phosphatgruppentransfer aktivierbar sind. Der von Medford neuerschaltete Biosensor nutzt den in der Zellmembran der Pflanzen lokalisierten eukaryotischen HK-Rezeptor, um nach dessen Aktivierung durch Zytokinin das modifizierte bakterielle Response Regulator-Protein PhoB-VP64 zu aktivieren. Dieses bindet im Pflanzenzellkern an einen synthetischen pflanzlichen Pho-Promotor, der die Expression nachgeschalteter Gene aktiviert. Die Pflanzen können laut Medford bei optisch messbarem Output als Biosensoren für Substanzen in der Umwelt genutzt werden.

Auf der Tagung wurde Maria Karlsson mit dem mit 10.000 Euro dotierten Barbara-Hobom-Preis ausgezeichnet. Preise für die besten Poster erhielten Alexander Lang und Almut Dufner.

### Laborwelt Bildkasten



### Doktoranden mit eigenem Vortragsprogramm

Einen eigenen Vortragsstrang sowie die Postersession der Tagung hatten die Doktoranden der „Spemann Graduiertenschule für Biologie und Medizin (SGBM)“ organisiert.

Dass durch Anwendung des Wissens, wie ein metabolisches Enzym im Laufe der Evolution seine Funktion anpasst, völlig neue synthetische Stoffgruppen oder Proteine entwickelt werden können, zeigte darin Joseph Noel (Salk Institute, La Jolla) anhand pflanzlicher Polyketid-Enzyme.

Yolanda Carrasco (CNB/CSIC Madrid) veranschaulichte das Zusammenspiel von Chemokin- und B-Zell-Rezeptoren während der

Aktivierung naiver B-Zellen zu Beginn einer Immunantwort sowie deren Auswirkungen auf die weitere B-Zell-Entwicklung.

Nancy Hynes (Friedrich Miescher Institut, Basel) zeigte, dass durch gezielte Hemmung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Brustkrebs erfolgreich bekämpft werden kann.

Victor de Lorenzo (CNB/CSIC Madrid) erläuterte, warum im Labor gezüchtete Mikroorganismen für Anwendungen der Umweltbiotechnologie in der freien Natur oft kläglich scheitern und wie sich in Bakterien ablaufende metabolische Prozesse auf einfache und elegante Art simulieren lassen.