

# Synthetische genetische Schalter in medizinischen Anwendungen

Sabrina Wend<sup>1,2</sup>, Kathrin Jakobus<sup>1</sup> und Wilfried Weber<sup>1,2,3</sup>, <sup>1</sup>Fakultät für Biologie, Universität Freiburg, <sup>2</sup>Spemann Graduate School of Biology and Medicine SGBM, Universität Freiburg, <sup>3</sup>BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg

Das Ziel der Synthetischen Biologie ist der rationale Entwurf und die Konstruktion von biologischen Verfahren und Systemen mit gewünschten Eigenschaften. Die Basis hierfür ist eine ständig wachsende Anzahl von gut charakterisierten Biomolekülen, die modular zu den gewünschten Systemen zusammengesetzt werden können. In diesem Übersichtsartikel soll dargestellt werden, wie einzelne biologische Komponenten zu genetischen Schaltern und Regelkreisen in tierischen Zellen kombiniert werden können, um damit neue Anwendungen in der medizinischen Forschung zu eröffnen. Im zweiten Teil wird dargestellt, wie die genetischen Schalter aus der Synthetischen Biologie in die Materialwissenschaften übertragen werden können, um dort neuartige Biomaterialien für zukünftige biomedizinische Anwendungen zu synthetisieren.

Die Grundlage komplexer synthetischer Genetzwerke in tierischen Zellen sind molekulare Schalter, die es ermöglichen, die Aktivität eines Gens über einen externen Stimulus zu steuern. Ein prominentes Beispiel eines solchen Schalters ist das sogenannte TET-System, mit dem einzelne Gene über die Gabe des Antibiotikums Tetrazyklin an- oder abgeschaltet werden können. Das TET-System basiert auf dem Tetrazyklin-Repressor TetR sowie seiner spezifischen Operator-Binde-Sequenz tetO.

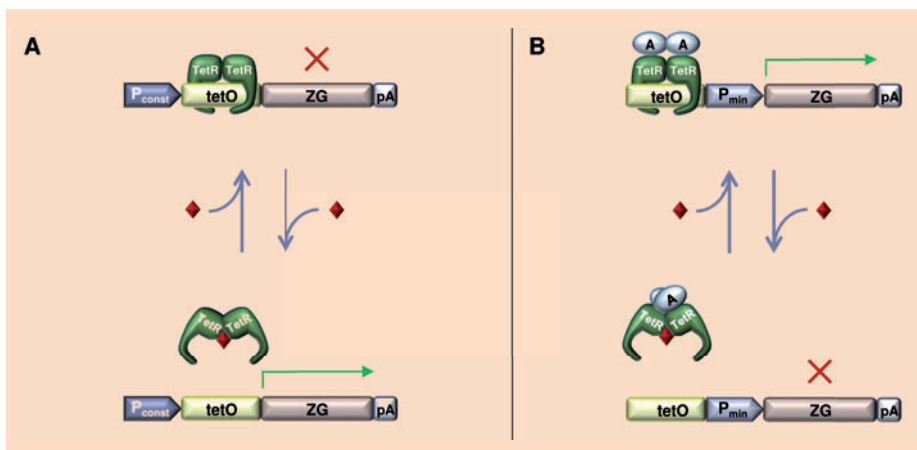
In Gegenwart steigender Tetrazyklin-Konzentrationen wird diese Protein-DNA-Interaktion dosisabhängig geschwächt. Solche Liganden-abhängigen Protein-DNA-Paare können verwendet werden, um die Genexpression in tierischen Zellen durch verschiedene Prinzipien zu steuern: In einer Repressions-basierten Konfiguration verhindert die Bindung des Repressors an seinen Operator die Aktivität eines konstitutiven Promoters (Abb. 1A), wogegen die Zugabe des externen Stimulus

die Protein-DNA-Bindung aufhebt und somit die Genexpression wiederhergestellt wird. In der sogenannten Aktivierungs-basierten Konfiguration wird der Repressor an eine Aktivierungsdomäne fusioniert. Dieses chimäre Protein kann nun dazu verwendet werden, um einen Minimalpromoter zu aktivieren, der an eine entsprechende Operatorsequenz fusioniert wurde. In dieser Konfiguration führt die Zugabe des externen Stimulus zu einer Abschwächung der Genexpression, da das aktivierende Protein von dem Zielpromoter abgelöst wird (Abb. 1B).

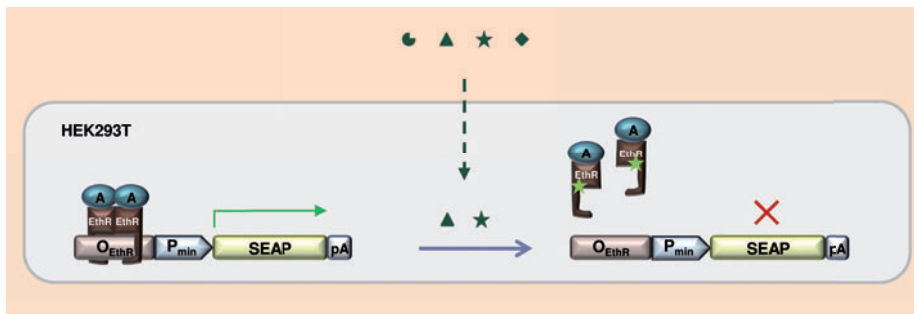
## Anwendungen biologischer Schalter im Gesundheitsbereich

Entdeckung neuer Wirkstoffe gegen Antibiotika-resistente Bakterien: In diesem Beispiel soll dargestellt werden, wie ein genetischer Schalter in menschlichen Zellen dazu verwendet werden kann, um neue Wirkstoffe gegen Antibiotika-resistente Bakterien zu entdecken. Die Verwendung tierischer Zellen hat zum Vorteil, dass schon im ersten Screening-Schritt Substanzen ausgeschlossen werden können, die entweder toxisch auf menschliche Zellen wirken oder die nicht in der Lage sind, in menschliche Zellen einzudringen, was besonders für die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger, wie zum Beispiel von Tuberkulosebakterien, notwendig ist.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie<sup>1</sup> wurde ein genetischer Schalter verwendet, um neue Wirkstoffe zu entdecken, die in der Lage sind, die intrinsische Resistenz von Tuberkulosebakterien gegen das Antibiotikum Ethionamid auszuschalten. In Tuberkulosebakterien führt die Interaktion des Repressorproteins EthR mit seiner Operatorsequenz OEthR zur Ethionamid-Resistenz. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine niedermolekulare Verbindung, die die EthR-OEthR-Interaktion hemmt, zu einer Abschwächung der Medikamentenresistenz führen sollte. Um solche Wirkstoffe zu entdecken, wurde analog zu dem Tetrazyklin-basierten System (Abb. 1B) ein genetischer Schalter konstruiert, der auf dem Repressorprotein EthR aus *Mycobacterium tuberculosis* und seiner Operatorsequenz OEthR beruht (Abb. 2). Dieser Schalter wurde in menschlichen Zellen implementiert und zum Screening einer chemischen Wirkstoffbibliothek verwendet. In diesem Prozess wurde der niedermolekulare Ester 2-Phenylethylbutyrat als Wirkstoff charakterisiert. Er ist in der Lage ist, in menschliche Zellen einzudringen, hat keine offensichtlichen Nebenwirkungen auf Zellen und ist in der Lage, die Bindung von EthR an seine Operatorsequenz zu inhibieren. Nachfolgende Untersuchungen an Tuberku-



**Abb. 1:** Konstruktion und Anwendung synthetischer biologischer Schalter. (A) Repressions-gesteuerter Schalter zur Kontrolle der Genexpression. Die Bindung des Tetrazyklin-Repressors TetR an seine DNA Operatorsequenz (tetO) reprimiert die Expression des Zielgens ZG (rotes Kreuz). Nach Zugabe von Tetrazyklin (rote Raute) löst sich TetR von tetO und der konstitutive Promotor ( $P_{const}$ ) wird de-reprimiert (grüner Pfeil). (B) Aktivierungs-gesteuerter Schalter zur Kontrolle der Genexpression. Der Tetrazyklin-Repressor TetR wird an eine Aktivierungsdomäne A fusioniert. Die Bindung dieses chimären Transkriptionsfaktors an den Operator tetO führt zur Aktivierung des Minimalpromoters  $P_{min}$  und zur Induktion der Genexpression. Durch Zugabe von Tetrazyklin wird die TetR-tetO-Interaktion gehemmt, und die Genexpression wird ausgeschaltet.



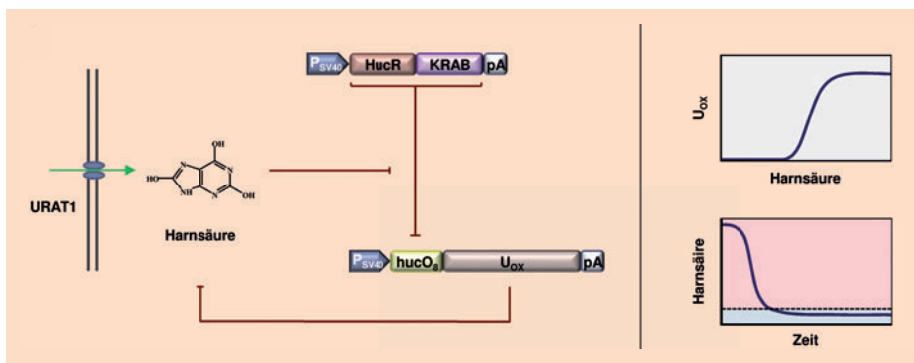
**Abb. 2:** Genetischer Schalter zur Entdeckung von pharmazeutischen Wirkstoffen. Analog zu dem Tetrazyklin-abhängigen genetischen Schalter (Abb. 1B) wurde der Repressor EthR aus *Mycobacterium tuberculosis* sowie die dazugehörige Operatorsequenz  $O_{EthR}$  verwendet, um die Expression des Zielgens sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) zu kontrollieren. Dieses System kann verwendet werden, um in einer chemischen Bibliothek Substanzen zu identifizieren, die in der Lage sind, EthR von  $O_{EthR}$  abzulösen, was durch eine erniedrigte SEAP-Expression angezeigt wird. Gleichzeitig können bei dieser Suche Substanzen ausgeschlossen werden, die zytotoxisch sind oder die nicht in der Lage sind, in Zellen einzudringen.

losebakterien zeigten, dass die Kombination von Ethionamid und 2-Phenylethylbutyrat zu einer effizienten Abtötung der Krankheits-erreger führte, wogegen gleiche Konzentrationen der individuellen Wirkstoffe keinen abtötenden Effekt zeigten<sup>1</sup>.

### Ein genetischer Regler zur Kontrolle der Harnsäurekonzentration bei Gicht

Etwa 1,4% der westlichen Bevölkerung leidet an Gicht, welche durch eine zu hohe Konzentration an Harnsäure im Blutserum verursacht wird. Die daraus resultierende Kristallisation von Harnsäure in Gelenken führt zu schmerz-

vollen Entzündungsreaktionen und Gewebeschäden. Auf der anderen Seite jedoch stellt Harnsäure einen effizienten Schutz gegen reaktive Sauerstoffradikale dar. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde ein genetischer Regelkreis entwickelt, der zum Abbau erhöhter Harnsäurekonzentrationen führt, jedoch physiologische Harnsäurekonzentrationen nicht beeinflusst<sup>2</sup>. Dieser Regelkreis basiert auf dem *Deinococcus radiodurans*-Repressorprotein HucR und seiner spezifischen Operatorsequenz hucO. Diese Protein-DNA-Interaktion wird durch pathologische Harnsäurekonzentrationen geschwächt. Analog zu dem Tetrazyklin-abhängigen Schalter (Abb. 1A) wurde ein



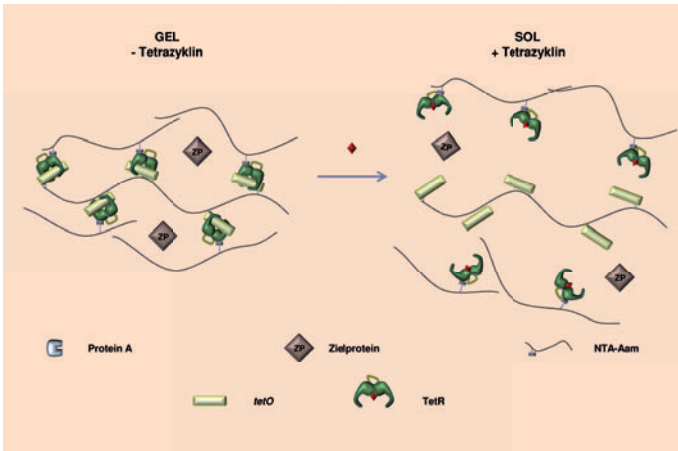
**Abb. 3:** Regelkreis zur Kontrolle der Harnsäure-Homöostase bei der Gicht-Erkrankung. Analog zu dem Tetrazyklin-abhängigen Kontrollsystem (Abb. 1A) wurde basierend auf dem HucR-Repressor und seinem oktameren Operator  $hucO_8$  ein Harnsäure-induzierbarer genetischer Schalter implementiert. Der Harnsäure-sensitive Repressor HucR wird als Fusionsprotein mit dem transkriptionellen Silencer KRAB exprimiert. Dieser chimäre Transkriptionsfaktor kann an seine Operatorsequenz ( $hucO_8$ ) binden und die Expression der Harnsäureoxidase ( $U_{ox}$ ) reprimieren. Bei erhöhter Harnsäurekonzentration im Medium steigt die intrazelluläre Harnsäurekonzentration, die durch das Transportprotein URAT1 vermittelt wird (grüner Pfeil). Mit steigender intrazellulärer Harnsäurekonzentration sinkt die Affinität von HucR zu  $hucO_8$ , und die Uratoxidase wird exprimiert (Schema rechts oben) wodurch eine Absenkung der Harnsäurekonzentration erfolgt. Sobald physiologische Konzentrationen dieses Metaboliten erreicht werden, bindet HucR-KRAB wieder an  $hucO_8$  woraufhin die Neuproduktion der Harnsäureoxidase wieder reprimiert wird. Somit stellt dieses Netzwerk einen Regelkreis zur autonomen Kontrolle der Harnsäurekonzentration dar.

genetisches Kontrollsystem konstruiert, so dass das Ziel-Gen nur bei erhöhten Harnsäurekonzentrationen angeschaltet wird (Abb. 3). Dieser Schalter wurde nun zur Konstruktion eines genetischen Regelkreises verwendet, indem als Zielgen eine Harnsäureoxidase eingefügt wurde. In dieser Konfiguration führen erhöhte Harnsäurekonzentrationen zur Produktion der Harnsäureoxidase, die wiederum zum Abbau der Harnsäure führt. Bei physiologischen Harnsäurekonzentrationen hingegen ist der genetische Schalter inaktiv, und es wird keine Harnsäureoxidase produziert (Abb. 3, rechts). Dieser Regelkreis wurde in menschlichen HeLa-Zellen implementiert, die anschließend in Alginatkapseln eingebettet und in ein Gicht-Mausmodell appliziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass dieses System zur Absenkung pathologischer Harnsäurekonzentrationen sowie zu einer Reduktion der Gicht-assoziierten Entzündungen führt<sup>2</sup>.

### Verwendung genetischer Schalter zur Synthese interaktiver Biomaterialien

Die oben aufgeführten Beispiele (für weitere Beispiele siehe Referenzen [3] sowie [4]) zeigen das Anwendungspotential genetischer Schalter in der Synthetischen Biologie. In einer kürzlich erschienenen Studie<sup>5</sup> wurde jedoch auch eindrücklich gezeigt, dass diese molekularen Schaltprinzipien nicht auf die Biologie beschränkt sind, sondern ebenso ein großes Anwendungspotential in den Materialwissenschaften besitzen, zum Beispiel um Materialien mit extern steuerbaren Eigenschaften herzustellen<sup>3</sup>.

Dieser Transfer eines genetischen Schalters aus der Synthetischen Biologie in die Materialwissenschaften wurde exemplarisch anhand des Tetrazyklin-Repressors TetR (Abb. 1A) gezeigt. Zur Synthese eines Tetrazyklinsensitiven Materials wurde sowohl TetR als auch die Operatorsequenz tetO an lineares Polyacrylamid gekoppelt. Durch Bindung von TetR und tetO erfolgte somit eine Quervernetzung der Polymerketten, was zur Ausbildung eines stabilen Hydrogels führte (Abb. 4). Durch Zugabe von Tetrazyklin konnte dieses Hydrogel dosisabhängig wieder aufgelöst werden. Es wurde gezeigt, dass sich dieses Material als extern steuerbares Depot für Wachstumsfaktoren oder therapeutische Proteine verwenden lässt. Hierzu wurde als Modellprotein Interleukin-4 eingebaut, und es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung dieses Proteins graduell über die Zugabe steigender Tetrazyklin-Konzentrationen gesteuert werden konnte (Abb. 4). Basierend auf diesem ersten Prototyp eines interaktiven Materials das auf einem genetischen Schalter aus der Synthetischen Biologie beruht, sollte es nun möglich sein, Biomaterialien herzustellen, die auf verschiedenste Stimuli re-



**Abb. 4:** Konstruktion eines Tetrazyklin-sensitiven Hydrogels zur induzierbaren Freisetzung eines Zielproteins. Das Hydrogel besteht aus linearem Polyacrylamid das entweder mit dem Tetrazyklinrepressor TetR oder seiner Operatorsequenz tetO funktionalisiert wurde. Durch die spezifische Affinität zueinander vernetzen TetR und tetO die Polymerstränge zu einem Hydrogel, das durch die anschließende Zugabe von Tetrazyklin dosisabhängig wieder aufgelöst werden kann. Dieses induzierbare Auflösen kann dazu verwendet werden, um ein therapeutisches Zielprotein auf Kommando aus diesem Hydrogel-Depot freizusetzen.

agieren, indem TetR/tetO durch ein anderes Repressor/Operator-Paar mit gewünschter Stimulus-Spezifität (z.B. für diverse Metaboliten, Medikamente oder Ionen) ersetzt wird. Dies würde die Entwicklung von Materialien für verschiedenste biomedizinische und analytische Anwendungen ermöglichen.

### Ausblick

Der rasante Wissensanstieg über biologische Komponenten ermöglicht das rationale Design und die Konstruktion synthetischer biologischer Systeme mit gewünschten Eigenschaften. Im Laufe des vergangenen Jahrzehnts gelang es, grundlegende Designprinzipien für synthetische biologische Systeme zu erarbeiten, mit denen nun erste Anwendungen der Synthetischen Biologie in der Gesundheitsforschung realisiert werden konnten. Diese Anwendungen sowie die Expansion der Synthetischen Biologie in andere Bereiche wie die Materialwissenschaften zeigen eindrücklich das große Potential dieser neuen Disziplin zur Entwicklung neuartiger Lösungsansätze für unerfüllte Herausforderungen.

### Literatur

- [1] Weber et al. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences 29: 9994–9998
- [2] Kemmer et al. 2010. Nature Biotechnology 4: 355–360
- [3] Jakobus et al. 2012. Chemical Society Reviews. doi: 10.1039/C1CS15176B
- [4] Ruder and Collins 2011. Science 333: 1248-1252
- [5] Christen et al. 2011. Advanced Functional Materials 21: 2861-2867

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Wilfried Weber  
 Fakultät für Biologie  
 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
 Tel: +49-(0)761-203-97654  
 Fax: +49-(0)761-203-97660  
 wilfried.weber@biologie.uni-freiburg.de

**DIE WAHL PAR EXCELLENCE  
 FÜR FORSCHUNGS- ODER  
 ROUTINE-PIPETTIEREN**

**Hochleistungs-Mikropipetten**  
*neu*  
**Acura® manual XS 826** - Reduziert in Gewicht und Länge, handliche Silhouette sowie optimierter Aktivierungskomfort garantieren eine effiziente Instrumentführung. **Die kompetente Forschungs-spezialistin für anspruchsvolle Anwendungen.**

**Universelle Mikropipetten**  
**Acura® manual 825** - Die klassische Linie, welche Ergonomie, regulierbaren Spitzenabwurf und Langlebigkeit mit der XS 826 gemein hat. **Die zuverlässige Sieger-Pipette für Routine Applikationen.**

WEITERE INFORMATIONEN:  
**SOCOREX ISBA SA**  
 Champ-Colomb 7  
 1024 Ecublens / Lausanne  
 Schweiz  
 Tel. +41 (0)21 651 6000  
 Fax +41 (0)21 651 6001  
 socorex@socorex.com  
 www.socorex.com

SWISS



## Die Vorzüge eines MiniVap™

Selbstverständlich würden Sie keinen Haartrockner verwenden, um chromatographische Proben in einer einzelnen Mikrotiterplatte zu verdampfen. Sie haben wahrscheinlich aber auch keine Lust Schlange zu stehen, um einen großen Evaporator in Ihrer Abteilung für denselben Zweck zu benutzen. In diesem Fall brauchen Sie einen Porvair MiniVap. Das Gerät ist klein, schnell, flexibel und beeinträchtigt Ihre Proben nicht. Weitere Information finden Sie unter [www.microplates.com/downloads.php](http://www.microplates.com/downloads.php)



Telephone: 0 26 83 / 4 30 94  
 Email: [info@dunnlab.de](mailto:info@dunnlab.de)  
[www.microplates.com](http://www.microplates.com)

porvair  
 sciences