

## Künstliche zelluläre Systeme

# Dynamische Peptidvesikel als Vorstufe synthetischer Zellen?

TOBIAS PIRZER

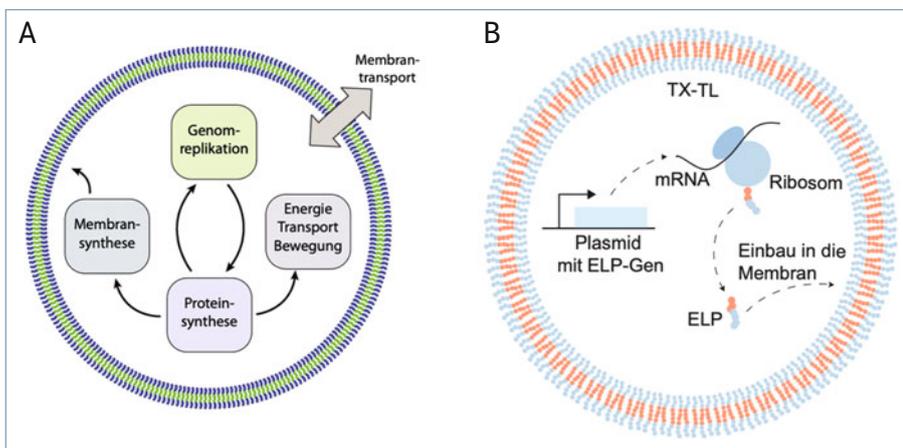
ZENTRUM FÜR NANOTECHNOLOGIE UND NANOMATERIALIEN (ZNN), TU MÜNCHEN

**Compartmentalization and spatial control of biochemical reactions are essential for the creation of artificial cellular systems. But it is notoriously difficult to implement reaction networks and membrane building blocks *in vitro*. In this article, we briefly highlight our work on the formation of peptide-based vesicles as artificial cell precursors with a size of up to 100  $\mu\text{m}$ . These cell mimics are able to produce RNA aptamers and proteins at the inside, and are further capable of strong growth.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1647-8  
© Der Autor 2021

■ Bei der Definition von künstlichen zellulären Systemen werden sehr häufig i) Einkapselung in Kompartimenten, ii) Wachstum und Teilung, und iii) die Fähigkeit das zu Grunde liegende Genom zu replizieren und weiterzugeben als essentielle Eigenschaften angeführt [1]. Zusammen sollten diese Charakteristika schließlich auch die Fähigkeit zu Darwinscher Evolution ausbilden. Die Erzeugung solcher synthetischen Lebens beinhaltet

jedoch zwingend die Kontrolle von verschiedenen Nichtgleichgewichtsprozessen und komplexen Reaktionsnetzwerken. Beispielsweise hat Tibor Ganti im Jahre 1971 das Modell des Chemotons [2] vorgestellt, das drei miteinander verbundene Reaktionszyklen enthält: einen metabolischen Zyklus zur Erzeugung von Bausteinen und Energie, einen Replikationszyklus für das Genom und einen Membranreplikationszyklus (**Abb. 1A**).



▲ **Abb. 1:** Illustrationen synthetischer Zellmodelle. **A**, Abstraktes Modell einer synthetischen Zelle. Das Zellwachstum ist hierbei eng mit der Replikation des Genoms verknüpft. Eine komplette Zelle benötigt hierfür einen Metabolismus für die Erzeugung von Bausteinen und Energie. Aus [5], CC BY 4.0. **B**, Illustration der Expression von Elastin-artigen Polypeptiden (ELPs) innerhalb von Vesikeln. Nach der Transkription der mRNA der ELPs erfolgt durch die Ribosomen des eingeschlossenen TX-TL-Systems die Translation. Exprimierte ELPs integrieren sich schließlich in die Vesikelmembran.

Neuere Modelle [3, 4] beziehen u. a. komplexere Reaktionszyklen sowie weitere Effekte mit ein, wie z. B. ein osmotisches Differential zwischen dem Inneren und dem Äußeren von Reaktionskompartimenten. Auf Grund der Verzahnung solcher von sich aus schon komplexen Zyklen ist die experimentelle Realisierung daher extrem herausfordernd. Zur Vereinfachung kann man diese Netzwerke in interne und externe Reaktionen unterteilen. Letztere beschreiben dann nur die Reaktionen für die Synthese bzw. Aufrechterhaltung eines Reaktionskompartiments mit einer Membran, wie z. B. einer Zelle. Die Herstellung von Membrankomponenten wäre dann eine Überschneidung bzw. die Kopplung mit internen Reaktionstypen. Will man nun moderne Zellen nachbauen, bedeutet dies die Herstellung von Phospholipiden innerhalb eines Liposoms. Und das ist auch ein Kern der aktuellen Forschung [5]. Es stellt sich jedoch an diesem Punkt die Frage, ob man nicht versuchen sollte, Bausteine zu verwenden, die in ihrer Herstellung, inklusive ihrer Ausgangsstoffe und ihrer genetischen Blaupause, weniger komplex sind als z. B. Phospholipide. Daher versuchen wir amphiphile Peptide als Bausteine zu verwenden, da sie vergleichsweise einfach innerhalb eines Peptidvesikels exprimiert werden können **Abb. 1B**, [6]. Diese Peptidosome unterscheiden sich aber in einigen physikochemischen Eigenschaften von anderen zellulären Strukturen, wie z. B. Liposomen. Allen voran sind das ihre Permeabilität und mechanische Stabilität, die letztlich Vorteile aber auch Nachteile nach sich ziehen könnten. Im Anschluss bleibt trotzdem noch die Herausforderung, die internen – vermutlich viel komplexeren – Reaktionszyklen mit den externen zu koppeln.

### Peptidosome aus Elastin-artigen Polypeptiden

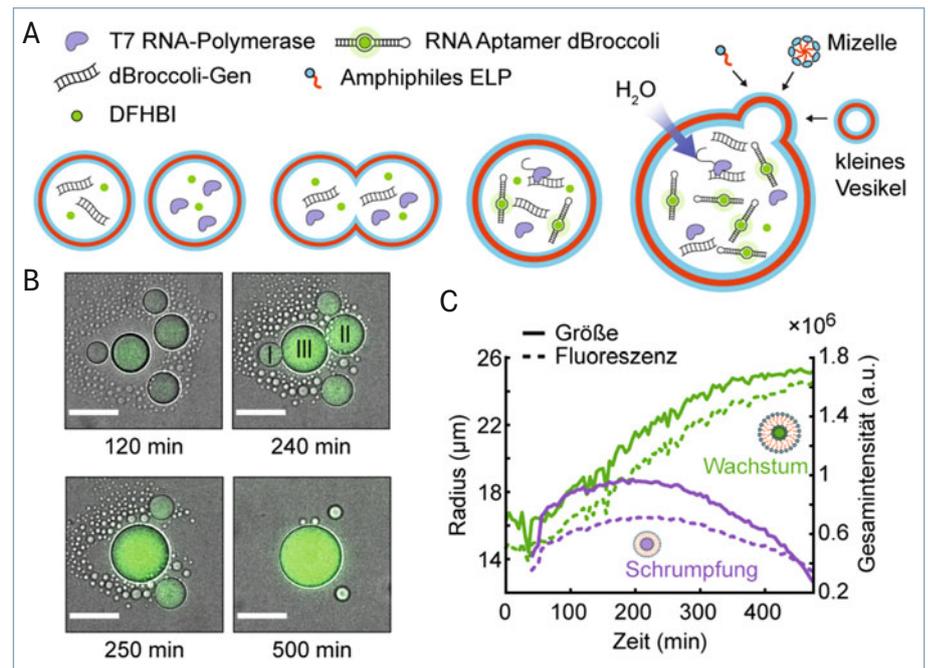
Wir haben uns die Aufgabe gesetzt, peptidbasierte Vesikel herzustellen, ihre Eigenschaften und Befähigung als Vorläufer künstlicher Zellen zu untersuchen. Aktuell fokussieren wir uns auf die Assemblierung

der Vesikel, deren Wachstum und Teilungsfähigkeiten. Wichtigstes Ziel ist dabei die Expression des amphiphilen Membranpeptides innerhalb des Vesikels. Die verwendeten Peptide sind Elastin-artige Polypeptide (ELPs), die als Amphiphil designt wurden. ELPs basieren auf der am häufigsten vorkommenden Wiederholungssequenz des Tropoelastins, und man verwendet üblicherweise  $(GXGVP)_n$ , wobei X eine beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Diese austauschbare Aminosäure kann nun benutzt werden, um den Charakter des Peptids zu anpassen. Hierbei gilt, je hydrophober die Aminosäure X, desto hydrophober auch das Peptid. Bei Erhöhung der Umgebungstemperatur findet ein Phasenübergang der ELPs statt, wobei sie wasserunlöslich werden und hydrophobe Koazervate bilden. Dieser Prozess ist vollkommen umkehrbar, wenn die Temperatur wieder erniedrigt wird. Daher ist die Übergangstemperatur  $T_t$  ein charakteristisches Merkmal eines jeden ELPs, das jedoch u. a. von der Salzkonzentration, dem pH-Wert usw. abhängt. Befindet sich die Umgebungstemperatur unterhalb  $T_t$ , so sind ELPs sehr gut in Wasser löslich. Diese aktive Schaltbarkeit [7] nutzen wir für die Assemblierung der Vesikel nicht aus, jedoch werden die amphiphilen ELPs so designt, dass die  $T_t$ -Werte der einzelnen Blöcke unterhalb bzw. oberhalb der üblichen Umgebungstemperaturen liegen.

### Expression in vesiculo

Zur Herstellung von Proteinen innerhalb von Vesikeln benutzten wir das TX-TL-System [8], ein bakterieller Zellextrakt, den wir selbst herstellen [9]. Solche Systeme beherbergen alle Komponenten des Expressionssystems von Zellen, wie z. B. *Escherichia coli*, aber keine DNA oder Membrankomponenten. Es ist aber notwendig, Ribonukleosidtriphosphate, Kofaktoren und eine Energiequelle, wie z. B. Phosphoenolpyruvat, zuzugeben.

Um die ELP-Vesikel zu assemblieren, verwenden wir bereits bekannte Methoden, nämlich die Knospung an Oberflächen und die Methode der Lösungsmittelverdampfung [10, 11]. Erstere resultierte in Vesikeln mit Durchmessern von wenigen hundert Nanometern. Durch Verwendung von Bulkfluoreszenzmethoden konnten wir nachzuweisen, dass in Vesikeln dieser Größenordnung die Expression von Membranproteinen und fluoreszierenden Proteinen stattfindet. Durch Anwendung eines FRET-Assays konnten wir



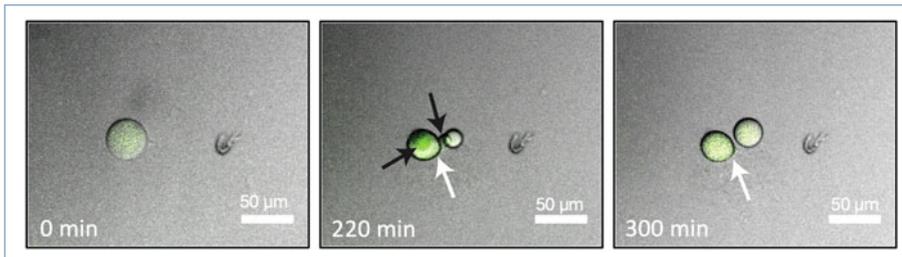
▲ **Abb. 2:** Dynamische Riesenvesikel. **A,** Vesikel, gefüllt mit Transkriptionsmix, um das RNA-Aptamer dBroccoli zu synthetisieren. Bindet das Aptamer das Fluorophor DFHBI, tritt Fluoreszenz auf. Durch Absorption von einzelnen Peptiden, ELP-Mizellen und kleineren Vesikeln kann es wachsen. **B,** Zeitlicher Verlauf von Vesikeln, die auf Grund von RNA-Polymerisierung wachsen und fusionieren. Die Bilder sind eine Kombination von lichtmikroskopischen Aufnahmen und Fluoreszenzbildern. Vesikel I, II und III fusionieren zu einem einzigen Vesikel. Größenbalken: 40 µm. **C,** Typischer zeitlicher Verlauf von Radius und Fluoreszenzintensität jeweils für ein wachsendes und ein schrumpfendes Vesikel. Aus [11], CC BY 4.0.

außerdem zeigen, dass sich *in vesiculo* exprimierte, amphiphile ELPs in die Membran der Vesikel einbauen [10].

### Wachstum und Teilung von Riesenvesikeln

Durch die Anwendung der Methode der Lösungsmittelverdampfung assemblierten sich schließlich Vesikel mit einer stark polydispersen Größenverteilung im Bereich 1–100 µm [11]. Zu Anfang wurden diese Riesenvesikel mit einem einfachen Transkriptionsmix (**Abb. 2A**) beladen, um das Verhalten der Vesikel zu untersuchen. Das verwendete DNA-Plasmid codiert ein RNA-Aptamer, das bei Anbindung des Fluorophors DFHBI fluoresziert. Die Polymerisierung von geladener RNA hatte aber zur Folge, dass der osmotische Druck im Inneren des Vesikels sich stark erhöhte und ein Vesikelwachstum auslöste. Durch das Vorhandensein von freien amphiphilen ELPs in hoher Konzentration in der externen Lösung, die sich in die bestehende Membran eingebaut haben, wurde ein Bersten des Vesikels verhindert. Ohne die Erzeugung des osmotischen Transmembrandifferentials durch Polymerisierung blieben die Vesikel statisch und haben ihre Größe

nicht verändert. Bei aktiver Transkription zeigten die Vesikel aber ein komplexes dynamisches Verhalten. **Abbildung 2B** zeigt ein übliches Beispiel, wie sich die Vesikel mit der Zeit entwickelten. Die grüne Fluoreszenz ist ein dabei direktes Maß für die Menge an transkribiertem RNA-Aptamer. Vor allem Gruppen von Vesikeln verhielten sich hier äußerst interessant. Zuerst bildeten sich oder wuchsen winzige Vesikel – die womöglich zuvor zu klein waren, um sie mikroskopisch aufzulösen – und flankierten die von Beginn an sichtbaren Vesikel, welche ebenfalls größer wurden. Hin und wieder gab es auch Fusionsprozesse, wie in **Abbildung 2B** zu sehen ist. Nach einer kurzen Zeit begannen die kleinsten Vesikel zu verschwinden, ohne dass weitere Fusionen sichtbar gewesen wären. Letztlich blieben ein großes oder wenige große Vesikel übrig, die jedoch auch irgendwann anfangen langsam zu schrumpfen. Wir vermuten, dass „Beute“-ELPs, wie einzelne Peptide, ELP-Mizellen und auch optisch nicht-auflösbare Vesikel, von den großen „Räuber“-Vesikeln absorbiert wurden. Da der Schrumpfprozess der Vesikel scheinbar ohne Kontakt ablief, müssten diese Vesikel ELPs als Beute an die Umgebung



▲ **Abb. 3:** Zeitlicher Verlauf von mehreren Knospungsereignissen. Der weiße Pfeil zeigt die typische Birnenform vor einer Knospung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf ablaufende Knospungen. Aus [11], CC BY 4.0.

abgeben. Entscheidend für „Fressen“ oder „Gefressen werden“ wäre somit das chemische Potenzial der Membranproteine, das u. a. vom sich aufbauenden osmotischen Differential abhängt. Ein vergleichbares Phänomen ist der Prozess der Ostwald-Reifung in kolloidalen Lösungen [12]. Hierbei lösen sich kleine Kolloide auf, wobei deren Bausteine von größeren Kolloiden aufgenommen werden. Dieser Netto-Flux an Bausteinen entsteht, weil das chemische Potenzial von größeren Kolloiden thermodynamisch günstiger ist als das Potenzial von kleineren.

Interessanterweise verhielten sich Vesikel, die TX-TL enthielten, weniger dynamisch. Anstelle des fluorogenen RNA-Aptamers wurde das fluoreszierende Protein YPet exprimiert, weshalb die antreibende Reaktion – die Transkription – nicht direkt beobachtet werden konnte. Es waren wieder ELPs in hoher Konzentration in der äußeren Lösung präsent, um Wachstum zu gewährleisten. Die Vesikel wuchsen bis zu einem Punkt und haben sich danach nicht mehr verändert. Die Datenlage lässt wieder auf eine Balance zwischen osmotisch getriebenem Wachstum und Polymerisierung von RNA schließen. Die TX-TL-Vesikel enthielten nahezu das komplette Proteom des *E. coli*-Stammes BL21 rosetta. Der osmotische Druck in den Vesikeln wurde in diesem Fall vermutlich durch ein viel komplexeres Netzwerk an biochemischen Reaktionen beeinflusst, woraus sich vermutlich ein stationärer Zustand einstellte.

Zu guter Letzt konnten wir noch sehen, dass unsere Peptidosome einen weiteren Punkt aus der anfänglichen Definition von künstlichen Zellen oder zumindest das Potenzial dafür erfüllten, nämlich die Teilung. **Abbildung 3** zeigt die einzige Aufnahme einer Serie von Teilungsereignissen, genauer gesagt von Knospungen, da sich die Tochtervesikel aus einem einzigen Muttervesikel ergeben, und schließlich zu einem einzelnen

Vesikel fusionieren. Der weiße Pfeil in **Abbildung 3** zeigt womöglich die typische Birnenform eines Vesikels vor einer Knospung [13]. Vermutlich hat die Zugabe des Detergens Triton X-100 die ELP-Membran ausreichend geschwächt, sodass auf Grund des osmotischen Differentials und spontaner Fluktuationen Knospungen stattfinden konnten.

### Fazit

Die Punkte Einkapselung und Wachstum der Definition von künstlichem Leben konnten wir bisher eindrucksvoll belegen. Jedoch müssen wir das Wachstum noch lernen zu verstehen und dann zu kontrollieren. Vor allem das erwähnte „Räuber-Beute-Verhalten“ in Vesikelgruppen, und ob es sich wirklich um eine Form der Ostwald-Reifung handelt, bleibt weiter spannend. Dasselbe gilt für die Teilung von Vesikeln. Wenn wir es schaffen werden Wachstum und Teilung kontrolliert ablaufen zu lassen, können wir die Frage aus dem Titel womöglich mit einem Ja beantworten.

Wie lange es noch dauern wird die Definition strikt zu erfüllen, ist nicht sicher zu beantworten. Der nächste große Meilenstein wäre die Selbstreplikation eines minimalen Genoms, das zumindest die Gene für den Membranbaustein und für seine Replikationsmaschinerie trägt. Die Erzeugung von künstlichen Zellen bleibt weiterhin eine faszinierende Aufgabe für alle Wissenschaftler:innen, die auf dem Gebiet der Syn-

thetischen Biologie arbeiten, und die uns weiterhin in Atem halten wird. ■

### Literatur

- [1] Hammer DA, Kamat, NP (2012) Towards an artificial cell. *FEBS Letters* 586, 2882–2890
- [2] Ganti T (2003) *The Principles of Life*. Oxford University Press
- [3] Piedrafita G, Monnard P-A, Mavelli F et al. (2017) Permeability-driven selection in a semi-empirical protocell model: the roots of prebiotic systems evolution. *Sci Rep* 7:3141
- [4] Piedrafita G, Ruiz-Mirazo K, Monnard P-A et al (2012) Conditions for a Compartmentalized Protometabolic System: A Semi-Empirical Approach. *PLOS ONE* 7:e39480
- [5] Voegelé K, Pirzer T, Simmel FC (2019) Genetically Encoded Membranes for Bottom-Up Biology. *ChemSystemsChem* 46:2543
- [6] Voegelé K, Frank T, Gasser L (2019) In Vesiculo Synthesis of Peptide Membrane Precursors for Autonomous Vesicle Growth. *J Vis Exp* 148
- [7] Goetzfried MA, Voegelé K, Mückl A et al. (2019) Periodic Operation of a Dynamic DNA Origami Structure Utilizing the Hydrophilic–Hydrophobic Phase-Transition of Stimulus-Sensitive Polypeptides. *Small* 15:1903541
- [8] Garamella J, Marshall R, Rustad M et al. (2016) The All E. coli TX-TL Toolbox 2.0: A Platform for Cell-Free Synthetic Biology. *ACS Synth Biol* 5:344–355
- [9] Falgenhauer, E, von Schönberg S, Meng C et al. (2021) Evaluation of an E. coli Cell Extract Prepared by Lysozyme-Assisted Sonication via Gene Expression, Phage Assembly and Proteomics. *ChemBioChem*, doi: 10.1002/cbic.202100257
- [10] Voegelé K, Frank T, Gasser L et al. (2018) Towards synthetic cells using peptide-based reaction compartments. *Nat Commun* 9:3862
- [11] Frank T, Voegelé K, Dupin A et al. (2020) Growth of Giant Peptide Vesicles Driven by Compartmentalized Transcription–Translation Activity. *Chem Euro J* 26:17356–17360
- [12] Hyman AA, Weber CA, Jülicher F (2014) Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:39–58
- [13] Sackmann E, Merkel R (2010) *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH Verlag

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Tobias Pirzer  
 Zentrum für Nanotechnologie und Nanomaterialien (ZNN)  
 Physik-Department  
 Technische Universität München  
 Am Coulombwall 4a  
 D-85748 Garching  
 pirzer@tum.de

### AUTOR



#### Tobias Pirzer

2001-2006 Studium der Biophysik an der TU München. 2010 Promotion bei Prof. Dr. T. Hugel an der TU München. Seit 2012 Senior-Scientist in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. C. Simmel, TU München.