

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Dezember 2010 (16.12.2010)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/142459 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01) *B01J 3/00* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/003534

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. Juni 2010 (11.06.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2009 024 757.2 12. Juni 2009 (12.06.2009) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FUHR, Günter, R.** [DE/DE]; Eintrachtstrasse 2, 13187 Berlin (DE). **BIER, Frank** [DE/DE]; Jägersteig 12, 14482 Potsdam (DE).

(74) Anwalt: **KATZAMEYER, Michael**; v. Bezold & Partner, Akademiestraße 7, 80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)

(54) Title: METHOD, COMPOSITIONS AND DEVICES FOR CONTROLLING A CHEMICAL REACTION BY PRESSURE, USING HIGH-PRESSURE OPTIMIZED BIOCOMPONENTS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN, ZUSAMMENSETZUNGEN UND VORRICHTUNGEN ZUR STEUERUNG EINER CHEMISCHEN REAKTION MITTELS DRUCK UNTER VERWENDUNG VON HOCHDRUCK-OPTIMIERTEN BIOKOMPONENTEN

(57) Abstract: The invention relates to methods, compositions and devices for controlling a (bio)-chemical reaction by pressure, using high-pressure optimized biocomponents. The methods and compositions according to the invention preferably use a combination of high-pressure optimized and low-pressure optimized biocomponents which may be present either next to each other or spatially separate from each other. The high-pressure optimized biocomponents preferably have a functional optimum at a pressure in the range of from 11 to 200, especially of from 30 to 200 MPa, and the low-pressure optimized biocomponents have an optimum at a pressure in the range of from 0.1 to 10 MPa. In a preferred embodiment of the invention, the high-pressure optimized biocomponents originate from deep sea organisms, especially obligately barophilic deep sea organisms.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen zur Steuerung einer (bio)chemischen Reaktion mittels Druck unter Verwendung von hochdruck-optimierten Biokomponenten. Bei den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen wird vorzugsweise eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten, welche nebeneinander oder räumlich getrennt voneinander vorliegen können, eingesetzt. Vorzugsweise weisen die hochdruck-optimierten Biokomponenten ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von 11 bis 200, insbesondere 30 bis 200 MPa, und die niederdruckoptimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa auf. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stammen die hochdruck-optimierten Biokomponenten aus Tiefseeorganismen, insbesondere obligat barophilen Tiefseeorganismen.

WO 2010/142459 A2

Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen zur Steuerung einer chemischen Reaktion mittels Druck unter Verwendung von hochdruck-optimierten Biokomponenten

Es ist seit langem bekannt, dass biochemische Reaktionen, insbesondere enzymatische Reaktionen, wenigstens teilweise über die Temperatur gesteuert werden können, da viele biologische Makromoleküle, insbesondere Enzyme, deutliche ausgeprägte Maxima ihrer Funktionsfähigkeit und Effizienz bei bestimmten Temperaturen aufweisen. Allerdings ist diese Steuerung meist auf einen relativ engen Temperaturbereich beschränkt und größere Temperaturänderungen nach oben oder unten führen in der Regel zum Abbruch der Reaktion. Nur wenige Biomoleküle sind auch bei deutlich verschiedenen Arbeitstemperaturen funktionsfähig, so dass zyklische Bioreaktionen wenigstens außerhalb eines Organismus nur schwer über die Temperatur steuerbar sind.

Eine Ausnahme und das Paradebeispiel für die Temperatursteuerung einer komplexen zyklischen Reaktion ist jedoch die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, insbesondere DNA. Bei dieser Reaktion macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, DNA-Stänge zu duplizieren. Dazu beginnt man mit einem oder mehreren kurzen Abschnitten doppelsträngiger DNA. Diese wird durch Erwärmung in Einzelstränge zerlegt und mit einem Primer mit einem freien 3'-OH-Ende gekoppelt. Diese Bindung und erste Phase wird als *Annealing* bezeichnet. Danach wird durch die Wirkung der DNA-Polymerase am Primer beginnend erneut ein Doppelstrang erzeugt. Denaturiert man anschließend die geschaffenen Doppelstränge wieder durch eine Temperaturerhöhung in Einzelstränge, können an diesen nach Abkühlung

neue Primer binden und der Prozess wiederholt sich. Setzt man in jedem PCR-Ansatz zwei solche Primer ein, einen der am sense-Strang der zweite, der am antisense-Strang bindet, so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung (Kettenreaktion) des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnittes. Verwendet man eine temperatur-stabile Polymerase, wie sie aus Organismen aus heißen Quellen gewonnen werden kann, so läuft die Reaktion ohne Unterbrechung ab, wenn man Temperaturzyklen fährt. In der Regel beginnt man zwischen 92-98°C mit der Denaturierung der DNA. Dann folgt eine Temperatur, die das Ankoppeln der Primer erlaubt. Diese ist auf den Primer abgestimmt und liegt bei etwa 50°C. Nach dem *Annealing* erhöht man auf die optimale Arbeitstemperatur der Taq-DNA-Polymerase, die bei ca. 72 °C liegt. Dann folgt wieder die Erhöhung über 90°C usw.

Wesentlich für dieses Prinzip der Amplifizierung ist das Vorhandensein von Molekülen mit verschiedenen Arbeitstemperaturen, die gleichzeitig bis zur höchsten und niedrigsten Temperatur stabil bleiben müssen. Im Falle der DNA fordert das sichere Aufschmelzen in Einzelstränge die höchsten Temperaturen (> 90°C), auf die die Stabilität der Primer abgestimmt werden muß. Die DNA-Polymerase arbeitet bei 72°C optimal und bleibt ebenfalls bei der Aufschmelztemperatur stabil. Auf der Basis dieser temperatur-gesteuerten Reaktionen wurden nach ihrer Einführung vor mehr als 20 Jahren die verschiedensten Modifikationen des Grundprinzips realisiert (RNA-Amplifikation, Kompetitive (RT-)PC, Nested-PCR, Multiplex-PCR, RACE-PCR, Inverse PCR, Vektoretten-PCR oder Alu-PCR sowie verschiedene Priming-Methoden). Die PCR ist inzwischen als zentrale bioanalytische Methode aus der Biotechnologie und Medizin nicht mehr wegzudenken. Durch den Einsatz von Light-Cyclern und anderen Geräten, die alternative Prinzipien zur Durchführung rascher Temperatursprünge realisieren, ar-

beitet die PCR-Technik robust und schnell. Dennoch stellen die hohen Temperaturen und auch die Temperaturänderungen deutliche Einschränkungen dar. So sind bislang keine weiteren Bioreaktionen nach einem ähnlichen Prinzip umgesetzt worden, da nicht viele Makromoleküle über die breite Temperaturstabilität und Reversibilität gegenüber Temperatursprüngen verfügen.

Aus dem Erfolg der temperatur-gesteuerten PCR-Verfahren leitet sich der Wunsch und die Forderung nach weiteren, insbesondere zum Thermocycling analogen Steuerprinzipien für biochemische Reaktionen ab. Da bei den PCR-analogen Verfahren alle Komponenten die T-Zyklen durchlaufen, müssen sie zumindest die höchste Temperatur ohne Schädigung tolerieren und dürfen nur bei ihrer Zyklustemperatur chemisch aktiv sein. Das schränkt die makromolekulare Kandidatenliste stark ein, denn meistens werden hohe Temperaturen ($> 70^{\circ}\text{C}$) von Normaltemperaturspezies entnommen Makromolekülen nicht toleriert. Bisher gibt es neben den temperaturgesteuerten Reaktionszyklen nur traditionelle Prinzipien, wie die pH-Steuerung oder etwa die Veränderung der Ionenstärke der Lösung. Derartige Parameter sind jedoch nicht ohne erheblichen technischen Messaufwand und vor allem nicht ohne Veränderung der Lösungszusammensetzung und Volumina möglich. Beides sind gravierende Nachteile.

Für eine alternative Steuerung von biochemischen Reaktionen werden Biokomponenten, z.B. Makromoleküle, wie Enzyme, Proteine und/oder Zucker, Organellen wie Ribosomen oder Mitochondrienkomponenten, benötigt, die über möglichst eine einzige technisch einfache und die Lösung nicht kontaminierende oder verändernde physikalische Größe im Arbeitspunkt der Reaktanten, wie sie im Folgenden allgemeiner genannt werden sollen, deutlich verschoben werden können. Diese Prozesse müssen na-

hezu vollständig, zumindest langzeit-reversibel sein. Das Spektrum der verwendbaren Moleküle und Komponenten sollte deutlich breiter als das der PCR-Technik sein. Die Änderung dieses oder dieser Parameter soll die Moleküle nicht schädigen sondern nur ihre chemische Wirksamkeit (Arbeitspunkte) deutlich verschieben. Besonders willkommen wäre ein Schwellwertverhalten (Ein/Aus).

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass die oben genannte physikalische Größe auch der Druck sein kann und eine Steuerung biochemischer Reaktionen mittels Druck realisierbar ist.

Die Druckabhängigkeit von Stoffwechselvorgängen wurde bei Normaldruckorganismen (1 atm), insbesondere Bakterien und Hefe, bereits in einzelnen Studien, allerdings noch nicht systematisch, untersucht. Bereits untersucht worden sind unter anderem Konformationsänderungen von Proteinen unter hohem Druck und es wurde gezeigt, dass die Funktion dieser Makromoleküle prinzipiell druckabhängig ist. Erhöht man beispielsweise den Druck auf normaldruckadaptierte Mikroorganismen, so kommen die Lebensprozesse bei etwa 10 bis 50 MPa zum Erliegen. Die DNA-Synthese erweist sich dabei neben anderem als am empfindlichsten und ausschlaggebend, während die RNA-Synthese erstaunlich drucktolerant zu sein scheint. Die Dissoziation von Ribosomen scheint ebenfalls wesentlich die Hochdrucktoleranz von Normaldruckorganismen zu limitieren (Yayanos, A.A. und Pollard, E.C. (1969) *Biophysics* 9, 1464-1482; Gross M. u.a. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218, 463-468).

Die Druckabhängigkeit der Genregulation ist mehrfach nachgewiesen worden. Es verwundert daher nicht, dass sich bei Druckerhöhung an Flachwasserorganismen eine starke Beeinträchtigung der Translations- und Transkriptionsvorgänge

zeigt (Kato, C. u.a. (1997), *J. Mar. Biotechnol.* 5, 210-218; Nakasone, K. u.a. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 351-356; Kato C. u.a. (1996), *J. Biochem.* 120, 301-305; Pole, R.K., Gibson, F. und Wu, G. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 214-224).

Auch die Membranzusammensetzung und deren Transporteigenschaften und Stabilität erwiesen sich als stark druckabhängig (siehe Pressure-regulated metabolism in microorganisms, Fumiyoshi Abe, Chiaki Kato und Koki Horikoshi, *TRENDS IN MICROBIOLOGY* 447, Band 7, Nr. 11, November 1999).

3T3-Mausfibroblasten sterben bei 70 MPa (entspricht einer Tiefe von 7000 m) in Kultur.

Andererseits lassen sich Bakterien aus der Tiefsee zwar bergen, zeigen aber optimale Wachstumsbedingungen erst bei hohen Drücken (je nach Tiefe des Lebensraumes 20 bis 50 MPa). (Bartlett, D.H. u.a. (1989) *Nature* 342, 572-574; Welch, T.J. und Bartlett, D.H. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 5027-5031; Michels, P.C., und Clark, D.S. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3985-3991; Welch, T.J. und Bartlett, D.H. (1998) *Mol. Microbiol.* 27, 977-985; Allen, E.E., Facciotti, D. und Bartlett, D.H. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1710-1720; Bidle, K. und Bartlett, D.H. (1999) *J. Bacteriol.* 181, 2330-2337.)

Schon bei reduzierten Drücken von 10 MPa sind Inhibitionen der Stoffwechselvorgänge von 80% und mehr zu verzeichnen. Auch Proteine aus Tiefseeorganismen, die tot geborgen wurden, konnten isoliert werden und zeigen je nach Tiefe der Herkunft ihrer Spenderorganismen stark oder weniger stark ausgeprägte druckspezifische Abhängigkeiten.

Aus physikalischer Sicht beeinflussen im Wesentlichen drei Effekte druckabhängig chemische Reaktionen auch in biologischen Systemen:

1. Die bereits genannte Druckabhängigkeit der Konformationszustände von Makromolekülen.
2. Die Reaktionsgeschwindigkeit jedweder chemischen Reaktion, die je nach Zu- oder Abnahme des Systemvolumens als der relevanten thermodynamischen Größe durch Druckänderungen schneller oder langsamer ablaufen.
3. Die Dissoziationsneigung, die mit steigendem Druck wächst, so dass mehr ionisierte Moleküle vorliegen. Das bedeutet auch, dass Multiproteincomplexe instabil werden.

Thermodynamisch wird dies über die nachfolgenden Gleichungen beschrieben:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1)$$

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = -\frac{\Delta V^*}{RT} \quad (2)$$

wobei K die Gleichgewichtskonstante ist, k die Geschwindigkeitskonstante, p der Druck (in Atmosphären), T die absolute Temperatur (Kelvin) und R die Gaskonstante ($\text{ml atm K}^{-1} \text{mol}^{-1}$); ΔV die Differenz zwischen dem Anfangs- und Endvolumen im Gesamtsystem bei Gleichgewicht (Reaktionsvolumen), ΔV^* die scheinbare Volumenänderung der Aktivierung (Aktivierungsvolumen) und den Volumenunterschied zwischen den Reaktanten und dem Übergangszustand repräsentiert: ist eine Reaktion von einer Volumenerhöhung begleitet, wird sie durch erhöhten Druck gehemmt, während eine von einer Volumenverringerung begleitete Reaktion durch erhöhten Druck gefördert wird.

Druckabhängige Änderungen des thermodynamischen Systemvolumens sind nicht mit Volumenänderungen des Organismus oder einer Zelle zu verwechseln. Es handelt sich vielmehr beispielsweise um Änderungen der Anlagerung von Wasser an Makromoleküle, Ionen und Membranen.

Allein aus der Thermodynamik chemischer Reaktionen kann also abgeleitet werden, dass die Druckabhängigkeit der metabolischen Reaktionen in Zellen die Lebens- und Stoffwechselvorgänge entscheidend beeinflusst. Bedenkt man, dass, wie sich aus den obigen Gleichungen ergibt, eine chemische Reaktion bei 1000 atm bis zu 200 000 Mal schneller ablaufen kann als bei 1 atm, allerdings ebenso entsprechende Verlangsamungen auftreten können, so ist sofort einsichtig, dass ständig unter hohem Druck lebende Organismen wie Tiefseeorganismen eine Anpassung und Abstimmung aller Reaktionen im Laufe der evolutionären Anpassung an die Tiefe vorgenommen haben müssen und schlechterdings nicht einfach unter Druckentlastung weiter zu leben vermögen. Es ist ebenfalls ersichtlich (und durch Untersuchungen belegt), dass solche Organismen aufgrund der erforderlichen Anpassung hochdruck-optimierte Zellbestandteile und Makromoleküle enthalten, welche zwar bei hohem Druck, nicht jedoch bei niedrigen Druck funktionsfähig sind, und damit als biologische Komponenten einer druckgesteuerten Reaktion geeignet sind.

Die Aufgabe, die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, nämlich die Bereitstellung eines alternativen Wegs zur einfachen und effizienten Steuerung biochemischer Reaktionen, wird somit erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung des Verfahrens zur Steuerung einer chemischen Reaktion mittels Druck unter Verwendung von hochdruck-optimierten Biokomponenten, insbesondere einer Kombination von hochdruck-optimierten Biokomponenten und niederdruck-optimierten Biokomponenten

nach Anspruch 1, sowie die Bereitstellung der Zusammensetzung nach Anspruch 15 und der Vorrichtung nach Anspruch 30. Weitere Aspekte und bevorzugte Ausführungsformen sind Gegenstand der weiteren Ansprüche.

Der Begriff „hochdruck-optimierte Biokomponenten“, wie hier verwendet, bedeutet, dass die entsprechenden Biokomponenten ein Optimum ihrer Aktivität, Funktionsfähigkeit und/oder Effizienz bei einem deutlich höheren Druck als Normaldruck aufweisen. Die hochdruck-optimierten Biokomponenten werden typischerweise ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von etwa 11 bis 200 MPa, vorzugsweise von etwa 21 bis 200 MPa, bevorzugter von 30 bis 150 MPa, noch bevorzugter von 50 bis 120 MPa, aufweisen.

Der Begriff „niederdruck-optimierte Biokomponenten“, wie hier verwendet, bedeutet dass diese Biokomponenten im Vergleich zu den hochdruck-optimierten Biokomponenten das Optimum ihrer Aktivität, Funktionsfähigkeit und/oder Effizienz bei einem deutlich niedrigeren Druck zeigen. Typischerweise werden die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 20 MPa, vorzugsweise 1 bis 10 MPa, aufweisen.

Wie aus den obigen Bereichsangaben hervorgeht, kann man Biokomponenten mit einem funktionellen Optimum in einem mittleren Bereich von etwa 11 bis 20 MPa sowohl als niederdruck- wie auch als hochdruck-optimierte Biokomponenten betrachten. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommt es bei einer Mischung von Hochdruck- und Niederdruckkomponenten in erster Linie darauf an, dass die beiden unterschiedlichen Komponenten klar abgegrenzte Funktionsmaxima bei unterschiedlichen Drücken aufweisen (wobei der höhere Druck dann die „Hochdruckkomponenten“ definiert), und weniger auf die absoluten

Werte der Druckmaxima. Allerdings wird die Verwendung von Biokomponenten mit Funktionsmaxima bei stark unterschiedlichen Drücken die Steuerung von Reaktionen mittels Druck naturgemäß erleichtern und u.a. aus den bereits angeführten Gründen ist die Isolierung von Biokomponenten mit diesen Charakteristika am erfolgversprechendsten, wenn solche Ausgangsorganismen verwendet werden, die an sehr unterschiedliche Drücke angepasst sind.

Die hochdruck-optimierten Biokomponenten stammen daher vorzugsweise aus Tiefseeorganismen oder einer daraus erhaltenen Zellkultur, während die niederdruck-optimierten Biokomponenten vorzugsweise aus Normaldruckorganismen oder einer daraus erhaltenen Zellkultur stammen. Diese Organismen enthalten jeweils funktionale Makromoleküle und daraus aufgebaute übergeordnete Strukturen wie Organellen etc., die druckadaptiert sind, d.h. die Effektivität, der Arbeitsbereich der Makromoleküle, Organellen oder Zellen, besitzt ein druckabhängiges Optimum. Alle Organismen auf der Erdoberfläche sind an den Luftdruck (ca. 1 atm) angepasst. Erhöht man den Druck, verlieren sie kontinuierlich oder auch sprunghaft an Reaktionsfähigkeit bis hin zur Inaktivität bei Drücken im Bereich von 10 bis 100 MPa. Genau umgekehrt verhält es sich bei Tiefseeorganismen. Ab einer Tiefe von 5000 m, wahrscheinlich schon ab 3000 m, treten obligat barophile Organismen auf. Diese können vor allem aus den genannten molekularen Gründen nicht an Normaldruck adaptiert werden. Einer der Gründe liegt in den auf die entsprechende Tiefe abgestimmten Optima der Arbeitsbereiche der Makromoleküle und nachfolgend höheren Strukturen, bis hin zu den Zellen und Geweben. Beispielsweise sind nahezu alle Membrantransportprozesse deutlich druckabhängig und folglich tiefseeoptimiert.

In einer typischen Ausführungsform der Erfindung wird daher eine Mischung von hochdruck-optimierten Biokomponenten, z.B. Hochdruckmolekülen, Organellen oder Zellen, die aus Tiefseeorganismen isoliert wurden, mit niederdruck-optimierten Biokomponenten, z.B. Niederdruckmolekülen, Organellen oder Zellen, aus Normaldruckorganismen für druckgesteuerte biochemische oder chemische Reaktionen, insbesondere zyklische Reaktionen, verwendet. Zur Steuerung zyklischer Reaktionsfolgen, aber auch bei der Verwendung von Zelllysaten oder anderen komplexen Reaktionsmischungen stellt dieses Prinzip ein Mittel dar, Einzelreaktionen eines Zyklus gegenüber anderen zu verlangsamen oder vollständig abzuschalten. Wird der Druck verändert, werden die anderen (inversen) Reaktionen verlangsamt oder ganz angehalten und nur die zuerst genannten laufen optimal ab. So besteht ein wesentliches Konzept des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, zwei oder mehrere Makromolekültypen oder Organellen, letztendlich auch Zelllysate oder auch funktionsfähige Zellpopulationen (im folgenden Reaktoren genannt) so zu mischen oder räumlich getrennt anzuordnen, dass einige der Reaktoren hochdruck-adaptiert (im Folgenden mit dem Zusatz „HP“) andere normaldruckoptimiert („NP“) sind.

Nimmt man den Extremfall eines obligat barophilen Tiefseeorganismus mit einem Optimum des Arbeitspunktes der in Frage kommenden molekularen oder zellulären Komponente bei 50 - 110 MPa und nahezu keiner Aktivität der Biosynthesekomponenten bei Normaldruck, aus dem man die entsprechenden Makromoleküle, Organellen oder auch Zellen funktionsfähig isoliert und diese mit anderen Komponenten, isoliert aus Normaldruckorganismen, mischt, so kann man die jeweiligen Reaktionen über Druckänderungen an- und abschalten oder auch bei dazwischen liegendem Druck (MP) gemeinsam verlangsamt ablaufen lassen. Prinzipien der Reaktionsabläufe sind in Fig. 1 dargestellt.

In einer speziellen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der zu steuernden chemischen oder biochemischen Reaktion um eine enzymatische Reaktion, insbesondere eine PCR-Reaktion oder eine andere Reaktion zur Vervielfältigung oder Manipulation von Nukleinsäure.

Der Begriff „Steuerung einer (bio)chemischen Reaktion mittels Druck“, wie hier verwendet, beinhaltet grundsätzlich jede Art der Beeinflussung des Ablaufs einer chemischen Reaktion durch die Vorgabe eines bestimmten Drucks und/oder durch Druckänderungen. Typischerweise beinhaltet eine solche Steuerung, dass die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion durch eine Druckänderung eingestellt werden kann und/oder dass die chemische Reaktion durch eine Druckänderung an- oder abgeschaltet werden kann. Die Reaktion kann z.B. zur Entnahme von Reaktionsprodukten oder Entnahme/Zufuhr von Reaktionspartnern vorübergehend oder dauerhaft gestoppt werden.

In spezielleren Ausführungsformen der Erfindung werden kontinuierliche oder periodische Druckänderungen vorgenommen, einschließlich Druckänderungen, die bestimmten vorgegebenen Funktionen, z.B. Funktionen mit sinusförmigen, rampenförmigen, rechteckigen, dreieckigen oder trapezförmigen Verläufen, folgen.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren können auch Zwischenzustände über MP (mittlere Druckniveaus zwischen HP und NP) definiert werden und Systeme mit mehreren Druckzuständen, z.B. Tristate oder Multistate (HP, MP1, MP2,..., NP), definiert werden. Insbesondere für Systeme und Verfahren, bei denen solche mittleren Druckniveaus realisiert werden, können auch Biokomponenten, die an solche mittleren Niveaus adaptiert sind, d.h. dort ein funktionelles Optimum aufweisen, eingesetzt werden. Geeignete Herkunftsorganismen für solche „mit-

teldruck-optimierten" Biokomponenten können beispielsweise aus Tiefen, die den jeweiligen Druckbereichen entsprechen, z.B. 1000 bis 3000 m für Drücke von 10 bis 30 MPa, gewonnen werden.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen werden die hochdruck-optimierten Biokomponenten typischerweise ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von etwa 11 bis 200 MPa, vorzugsweise von etwa 21 bis 200 MPa, bevorzugter von 30 bis 150 MPa, noch bevorzugter von 50 bis 120 oder 150 MPa, aufweisen und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 20 MPa, vorzugsweise 1 bis 10 MPa, aufweisen.

Eine Mischung von hochdruck-optimierten Biokomponenten und niederdruck-optimierten Biokomponenten kann beispielsweise Komponenten mit einem funktionellen Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa oder 1 bis 10 MPa und Komponenten mit einem funktionellen Optimum bei einem Druck im Bereich von 11 bis 200 MPa umfassen oder kann Komponenten mit einem funktionellen Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 20 MPa und Komponenten mit einem funktionellen Optimum bei einem Druck im Bereich von 21 bis 200 MPa, z.B. 30-200 MPa oder 50-120 MPa, umfassen. Insbesondere bei Systemen und Verfahren, bei denen mehrere stabile Druckzustände realisiert werden sollen, können auch noch Biokomponenten mit einem funktionellen Optimum bei einem mittleren Druck zwischen dem jeweiligen „Niederdruck“ und „Hochdruck“ eingesetzt werden.

Obwohl das erfindungsgemäße Verfahren grundsätzlich druckgesteuert wird, kann es in bestimmten Ausführungsformen vorteilhaft sein, zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen zu

arbeiten und gegebenenfalls eine zusätzliche Temperatursteuerung vorzunehmen.

Wie bereits oben erwähnt, betrifft ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung eine Zusammensetzung von Komponenten, insbesondere zur Durchführung mindestens einer (bio)-chemischen Reaktion, die eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten, welche nebeneinander oder räumlich getrennt voneinander vorliegen können, umfasst.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen werden die hochdruck-optimierten Biokomponenten typischerweise ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von etwa 11 bis 200 MPa, vorzugsweise von etwa 21 bis 200 MPa, bevorzugter 30 bis 200 MPa, noch bevorzugter von 50 bis 120 MPa, und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 20 MPa, vorzugsweise 1 bis 10 MPa, aufweisen.

Diese Biokomponenten sind vorzugsweise aus der Gruppe aus biologischen Makromolekülen, Molekülaggregaten, Organellen, Zellen, Zellmembranen oder Zelllysaten ausgewählt. Die Biokomponenten können grundsätzlich alle Zellbestandteile und biologische Materialien umfassen, die an einer biochemischen Reaktion beteiligt sein können und umfassen insbesondere biologische Katalysatoren, z.B. Enzyme und Coenzyme, Membrankomponenten, Nukleinsäuren, Proteine oder Zucker.

Vorzugsweise stammen die hochdruck-optimierten Biokomponenten der Zusammensetzung von einem Tiefseeorganismus oder einer daraus erhaltenen Zellkultur.

Als geeignete Tiefseeorganismen kommen grundsätzlich alle Organismen aus Tiefen von mehr als 1000 m, vorzugsweise mehr als 2000 m, bevorzugter mehr als 3000 m, noch bevorzugter mehr als 5000 m, insbesondere einem Bereich von 5000-10.000 m, in Frage. Organismen aus Tiefen von mehr als 5000 m werden aus den oben angeführten Gründen in der Regel obligat barophil sein. Geeignete Organismen umfassen sowohl Makroorganismen (Tiere, Pflanzen, allgemein Vielzeller) als auch Mikroorganismen (insbesondere Archaeobakterien, Bakterien und Hefen). Mikroorganismen werden in der Regel bevorzugt sein, da diese besonders robust extreme Bedingungen tolerieren und leichter lebend zu gewinnen und zu kultivieren sind.

Einige nicht-beschränkende Beispiele für geeignete Organismen und deren Herkunftsorte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1

<u>Bezeichnung</u>	<u>Tiefe</u>	<u>Ort des Vorkommens</u>
Seegurke (Holothuroidea)	10.911 m	Marianengraben, westl. Pazifik
Abyssobrotula Galathea	9.600 m	Marianengraben, westl. Pazifik
Gießkannenschwamm (Euplectella Aspergillum)	5.000 m	Westlicher Pazifik
Versch. Mikroorganismen, Hefen und Bakterien	10.897 m	Marianengraben, westl. Pazifik
Fadenwurm (Nematode)	5.000 m	Indischer Ozean
Garnelenartige Krustentiere (Amphipoden)	10.000 m	Marianengraben, westl. Pazifik
Versch. Krabben, Würmer und Spuren von Holothurien (Seewalzen oder Seegurken)	5.000 m	Atlantik, westl. d. kapv. Ins.
sowie 30 cm Rattenschwanzfisch (Macrouridae).		

Ein spezielles Beispiel für einen geeigneten barophilen Mikroorganismus ist das bereits in der Literatur beschriebene und kultivierte Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii*.

Geeignete Normaldruck- oder Niederdruckorganismen umfassen ebenfalls sowohl Makroorganismen (Tiere, Pflanzen, allgemein Vielzeller) als auch Mikroorganismen, insbesondere Archaeobakterien, Bakterien und Hefen.

Bei der Herstellung der Zusammensetzungen können z.B. Gemische aus HP- und NP-Fraktionen, gewonnen aus Zellen von HP- und NP-Organismen oder in vitro-Zellkulturen Verwendung finden. Die Zusammensetzungen können auch durch Ersatz von einer oder mehreren Komponenten einer NP-Fraktion durch HP-Komponenten oder Ersatz von einer oder mehreren Komponenten einer HP-Fraktion durch NP-Komponenten gebildet werden.

In einer Ausführungsform werden HP- und NP-Zelllysate oder aus diesen hergestellte Fraktionen für die Biosynthese genutzt (ausführlicher im folgenden Abschnitt „zellfreie Biosynthese“ beschrieben).

In einer speziellen Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Zusammensetzung vollständige oder partielle Fusionen von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Zellen. „Partiell“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Verschmelzung von lediglich Membrankomponenten einer Zellspezies mit Membrankomponenten oder ganzen Zellen der anderen Zellspezies.

Ein weiterer verwandter Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens oder der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zur Herstellung und/oder zum Betrieb eines durch Druck steuerbaren Systems und dieses System selbst.

Spezieller handelt es sich bei dem durch Druck steuerbaren System um ein System zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen, ein Transportsystem, ein System zur Erzeugung,

Speicherung oder Umwandlung von Energie, ein Membransystem, einen Sensor, oder einen Schalter.

In einer grundsätzlichen Ausführungsform beinhaltet dieses System, das eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten enthält, mehrere einstellbare Druckzustände, wobei die verschiedenen Druckzustände jeweils einen weiteren Parameter des Systems bestimmen.

Dieser weitere Systemparameter kann beispielsweise eine bestimmte Ladung oder Konformation, einen bestimmten Informations- oder Energiezustand etc. von Systemkomponenten umfassen oder repräsentieren.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen druckgesteuerten Verfahrens, insbesondere eines erfindungsgemäßen druckgesteuerten Biosyntheseverfahrens.

Eine solche allgemeine Vorrichtung umfasst mindestens eine Synthesekammer (1), ein Druckerzeugungssystem (2), mindestens einen Zufluss (3), und mindestens einen Abfluss (4).

Weiterhin wird die Vorrichtung typischerweise noch Sensoren (5), und eine Einrichtung (6) zur Erfassung und Verarbeitung der von den Sensoren erhaltenen Daten umfassen.

In einer spezielleren Ausführungsform der Vorrichtung umfasst die Synthesekammer zwei verstellbare Wände (11,13), deren Abstand mit einem Abstandssystem (12) regelbar ist, das Druckerzeugungssystem (2) zwei Verstellelemente (24, 25), die an einem Spannungsgenerator (211) angeschlossen sind, sowie einen stabilen Rahmen (212) als Gegenlager.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Verstellelementen um Piezoelemente. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass mindestens eine Wand der Synthesekammer transparent ist, z.B. eine druckfeste Glasplatte darstellt, um z.B. eine leichte Beobachtung der Synthesereaktion zu gestatten.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung bilden die verstellbaren Wände die untere und die obere Begrenzung der Synthesekammer und der maximale Abstand der verstellbaren Wände ist geringer als die Länge und Breite der verstellbaren Wände.

Figur 7 zeigt beispielhaft eine solche Synthesekammer mit den Grundelementen zur Druckerfassung und -steuerung. Die eigentliche Kammer besteht aus zwei Platten (71, 73), die auch dicke Glasplatten sein können, so dass die Reaktion ggf. beobachtet bzw. Licht eingestrahlt werden kann. Diese Platten werden über ein Abstandssystem (72) auf Distanz gehalten. Die Druckerzeugung in der mehr flachen als hohen Synthesekammer (76) erfolgt über zwei Piezoverstellelemente (74, 75), die an einen Spannungsgenerator (711) angeschlossen sind. Werden sie mit einer Spannung beaufschlagt, drücken sie die Platten (71, 73) der Synthesekammer zusammen, wodurch im geschlossenen System der erforderlich hohe Druck erzeugt wird. In einem stabilen Rahmen (712) finden diese Elemente ihr Gegenlager. In der Reaktionskammer können sich noch Sensoren (79, Druck, Temperatur, Reaktantenkonzentrationen etc.) befinden, die über eine Elektronik (710) ausgelesen und die Daten verarbeitet werden. Dies kann nicht nur zum Zwecke der Überwachung sondern auch aus Regelgründen erfolgen. Insbesondere wird die Änderung des Druckes auf diese Weise programmierbar und dem Stand der Reaktion anpassbar. Die Synthesekammer verfügt über Zuflüsse (77a und b) sowie Abflüsse (78), wobei hier beispielhaft zwei Zuflüsse (z.B. zum Mischen der HP- und NP-

Reaktanten) und ein Ausfluss dargestellt sind. Die Zu- und Abflüsse sind mit Hochdruckventilen (713) öffnen- und schließbar.

Mit den erfindungsgemäßen Vorrichtungen können Einzelreaktionen oder Reaktionsfolgen, vor allem auch in zyklischer Weise, ausgeführt werden und dabei Drucksprünge oder -änderungen im Bereich von typischerweise 0,1 bis 200 MPa vorgenommen werden. Die Druckverläufe können vorgegeben und überwacht werden und können beliebigen Funktionen folgen (sinusförmiger Verlauf, Rechteck oder Rampen, Trapezverläufe etc.). Entsprechende Kammern sollten keine Gasräume enthalten und sind weitestgehend geschlossen auszuführen, zumindest, wenn die Hochdruckreaktionen ablaufen.

Fig. 8 zeigt schematisch die Drucksteuerung in einer erfindungsgemäßen Synthesevorrichtung (Reaktionskammer mit Druckperipherie). Eine Reaktionskammer (1) ist über ein Leitungssystem (2) mit Komponenten zur Druckerzeugung und -Messung verbunden. Einzelne Bereiche sind über Ventile (3) getrennt. Der Basisdruck p^0 wird von außen eingeleitet und an einem ersten Manometer (4) gemessen. Ein hydraulischer Verstärker (5) vervielfältigt diesen Druck mit einer festen Verstärkungsfaktor A. Dieser Druck wird in die Reaktionskammer eingeleitet. Gleichzeitig kann mit einer motorisierten Pumpe (6) ein zeitlich variabler Druck p^1 additiv überlagert werden. Der resultierende Gesamtdruck wird in einem zweiten Manometer (7) gemessen. Reaktionsprodukte können über Auslässe (8 und 9) nach außen abgeleitet werden.

Fig. 9 zeigt eine Variante dieser Synthesevorrichtung, bei der die Reaktionskammer doppelwandig ausgeführt ist. Zwischen dem inneren Reaktionsvolumen (11) und dem äußeren Volumen (12) können dann zusätzlich Diffusionsfenster (13) vorgesehen

werden. Über diese können Edukte und Produkte über ein weiteres Absperrventil (3) zu- oder abgeführt werden.

Solche Vorrichtungen eignen sich sowohl für Mikrosysteme (wie z.B. typischerweise für PCR-Reaktionen eingesetzt) als auch für große Reaktionsvolumina im Bereich von Millilitern bis Kubikmetern, da Druck ein intrinsischer Parameter ist, der sich sehr rasch im gesamten Volumen einstellt (im Unterschied zur Temperatur, der Ionenkonzentration oder dem pH-Wert). Dies stellt einen zusätzlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren dar.

Bei den erfindungsgemäßen druckgesteuerten Biosyntheseverfahren wird vorzugsweise mit periodischen Druckänderungen, z.B. im Bereich von 0,1 MPa bis 200 MPa, gearbeitet. Die Druckänderungen können dabei in Zeitintervallen von Mikrosekunden bis Stunden vorgenommen werden. Mit gegenläufigen Spritzensystemen wie aus der HPLC-Technik bekannt und beispielhaft in Fig. 8 und 9 dargestellt, ist eine solche Feineinstellung des Drucks problemlos möglich.

Kurzbeschreibung der Figuren

Fig. 1 Schematische Darstellung des Steuerung einer Reaktion mit verschiedenen Druckzuständen

Fig. 2 Schema der Herstellung einer Zusammensetzung mit hochdruck- und niederdruck-optimierten Biokomponenten

Fig. 3 Schematische Darstellung einer druckgesteuerten PCR

Fig. 4 Schematische Darstellung eines Tristate-Grundelements für einen Biocomputer

Fig. 5 Schematische Darstellung eines Membransystems mit Niederdruck- und Hochdruckkomponenten

Fig. 6 Schematische Darstellung einer druckgesteuerten Biobatterie

Fig. 7 Schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Synthesevorrichtung mit Drucksteuerung

Fig. 8 Schematische Darstellung der Drucksteuerung in einer erfindungsgemäßen Synthesevorrichtung

Fig. 9 Schematische Darstellung einer Synthesevorrichtung mit Drucksteuerung und Diffusionsöffnungen

Im Folgenden werden verschiedene Anwendungsbeispiele beschrieben, welche die vorliegende Erfindung näher erläutern und das breite Spektrum der unterschiedlichen Nutzungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen aufzeigen, jedoch nicht darauf beschränken sollen.

Die Anwendungsbeispiele basieren auf den folgenden Grundannahmen:

1. Alle Reaktanten (z.B. Makromoleküle, Molekülcluster, Organellen, Zellen) halten sowohl HP- als auch NP- Belastung aus und sind reversibel in ihren Veränderungen.
2. Ein HP-Reaktant bleibt ein HP-Reaktant, auch wenn er eine Reaktion durchläuft und verändert wird.
3. Gleiches gilt für NP-Reaktanten.
4. Folgendes Verhalten der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wird angenommen:
 - Ein NP-Reaktant hat bei HP eine sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit.
 - Ein NP-Reaktant hat bei NP seine maximale Reaktionsgeschwindigkeit.
 - Ein HP-Reaktant hat bei NP eine sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit.

- Ein HP-Reaktant hat bei HP seine maximale Reaktionsgeschwindigkeit.
- Ein NP-Reaktant hat bei MP (zwischen HP und NP liegender Druck) eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit, er reagiert jedoch noch.
- Ein HP-Reaktant hat bei MP eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit, er reagiert jedoch noch.

Mit diesen Grundannahmen werden im Folgenden idealisierte und vereinfachte Systeme beschrieben. Es gibt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Reaktanten, die nach einer Reaktion von HP- in MP- oder sogar in NP-Reaktanten übergehen, weil sie in der neuen Konfiguration weniger druckabhängig sind. Es wird auch Reaktanten geben, die kaum oder vollständig druckabhängig sind. Solche Reaktanten könnten für komplexere und eventuell noch wirkungsvollere Anwendungen ebenfalls vorteilhaft eingesetzt werden.

Biokomponenten, welche als Reaktanten den obigen Grundannahmen bzw. Voraussetzungen entsprechen, können aus hochdruck- bzw. niederdruck-adaptierten Organismen gewonnen, in Routineverfahren getestet und dann eingesetzt werden.

Die für die folgenden Ausführungsbeispiele typischerweise nutzbaren Druckbereiche sind:

HP - Hochdruck (zwischen 50 und 200 MPa, 500 bis 2000 atm)

MP - Mitteldruck (zwischen 10 und 50 MPa, 100 bis 500 atm)

NP - Niederdruck (zwischen 0,1 und 10 MPa, 1 bis 100 atm).

Dabei handelt es sich jedoch nur um beispielhafte und generalisierte Bereiche, die im Einzelfall in ihren Grenzen verschoben und auf die jeweiligen Reaktanten abgestimmt festgelegt werden müssen und können. Es ist auch zu berücksichtigen, dass bestimmte Biokomponenten (z.B. solche aus Tiefsee-

organismen, welche aus einer relativ mäßigen Tiefe von etwa 3000 m geborgen wurden) voraussichtlich weder bei HP noch NP sondern nur bei MP ihre größte Aktivität aufweisen werden. Auch mit solchen Komponenten lassen sich analoge, in mehreren Druckstufen gestaffelte Reaktionssysteme entwickeln.

Zellfreie Synthese

In den letzten 10 Jahren hat sich das Feld der zellfreien Biosynthese rapid entwickelt. Dazu werden Zelllysate benutzt, gewonnen aus Hefen, *E.coli*, aber auch höheren Zellen, die durch geeignete Handhabung (niedrige Temperaturen, pH-Änderung, Energie-Verarmung oder Blockierung des Stoffwechsels) reaktionsfähig gehalten werden. Hebt man diese Blockierungen oder Reduzierungsmaßnahmen auf, so reagiert das System durch, um im thermodynamischen Gleichgewicht zu enden. Diese letzte geordnete Reaktionskette wird genutzt, in dem man ein oder mehrere mRNA-Typen in großer Menge zugibt, deren codierten Proteine dann in dem Zelllysate produziert werden. Auf diesem Wege wurden bereits mehrere hundert Proteintypen synthetisiert, die durchaus auch toxische Eigenschaften aufweisen können, da keine lebende Zelle zur Synthese benutzt wird. Das Prinzip ist allerdings bisher von einer Vielzahl technologischer Schwierigkeiten begleitet. Das sind einmal der schnelle Verfall der Reaktionsfreudigkeit des Zelllysats, zum anderen die mangelnde Kontrolle der Reaktionen, wenn diese einmal in Gang gekommen sind, letztendlich auch die Einmaligkeit der Nutzung. Des Weiteren bereitet die Skalierung hin zu größeren Volumina und Mengen der Produkte Schwierigkeiten. Insbesondere wäre es sehr hilfreich, wenn man die Inaktivierung/Aktivierung der Zelllysate und entsprechend komplexer Reaktionsgemische auf einfache Weise steuern könnte. Ähnlich kurzlebigen Isotopen ist die Handhabung der Reaktionsgemische nur zeitlich sehr begrenzt möglich und daher jede Art von Steuerung und Synchronisation willkommen. Dies ist erfin-

dungsgemäß über die Beimengung oder auch komplette Nutzung von Komponentenketten oder Zelllysaten aus hochdruckadaptierten Tiefseeorganismen gelöst.

Im einfachsten Fall nutzt man ein Zelllysate aus einem Tiefseeorganismus, in dem dann sehr viele oder alle Komponenten HP-optimiert sind. Das kann auch eine aus einem solchen Organismus oder durch Adaptierung erzeugte in vitro Zellkultur sein, die unter Hochdruck kultiviert wird und das Zellplasmalysat liefert. Es ist bekannt, dass insbesondere die DNA-bezogenen Reaktionsabläufe sehr stark druckabhängig sind. Das bedeutet, bei einem Organismus aus 6000 - 10000 m Tiefe, liegt der optimale Arbeitsbereich der makromolekularen Komponenten bei einem Druck von 60 bis 100 MPa (600 bis 1000 atm). Für viele dieser Reaktionskomponenten ist deren Reaktionsfähigkeit bei Normaldruck auf wenige Prozent oder darunter reduziert bzw. komplett unmöglich. Ungeachtet dessen tolerieren sie eine derartige Druckänderung über zwei Dekaden nahezu reversibel für bestimmte Zeiten (Stunden bis Tage). Somit kann ein derartiges Zelllysate, ein reaktives Vielkomponentensystem oder auch ein Zellorganellensystem über einfachen Druckwechsel zwischen z.B. 80 MPa und 0,1 MPa an- und abgeschaltet werden (Fig. 2A). Wird kein so großer Druckwechsel vorgenommen, lassen sich die Reaktionen auch graduell manipulieren. Dies wäre z.B. der Fall, wenn man im MP-Bereich arbeitet. Zusätzlich kann noch über die Temperatur gesteuert werden. Tiefseeorganismen sind in der Regel an sehr konstante Temperaturen bei etwa 4°C angepasst. Da Änderungen im Grad-Bereich oder darunter liegen, sind sie weniger stark temperaturtolerant als Vergleichsmoleküle, Organellen etc., die aus Oberflächenorganismen isoliert wurden. Die Temperatur (geringere oder höhere) kann in diesem Fall zusätzlich zur Anschaltung oder Abschaltung der Reaktionen verwendet werden.

Im Fall der Nutzung eines HP-Zelllysats kann dessen Reaktionsfähigkeit neben den bereits genutzten Prinzipien nahezu vollständig über die Druckänderung gesteuert werden. Bei NP ist das System reaktionsblockiert und beginnt zu arbeiten, wenn der Druck sprungweise oder langsam erhöht wird (HP-Modus). Auf diese Weise lassen sich Zelllysate an unerwünschter oder zu früher Reaktion hindern.

Weitere Ausführungsformen stellen verschiedenste Zumischungen von HP-Komponenten isoliert aus Tiefseeorganismen zu Zelllysaten aus NP-Organismen dar. Dies können z.B. isolierte Komponenten sein, die für die Energiebereitstellung im Zelllysate erforderlich sind (z.B. ATP/ADP, NADPH/NADH, aber auch Organellen, wie Mitochondrien oder lebende Zellen, hier mit A_1 bezeichnet) oder den Energietransport betreffen (Fig. 2B). Des Weiteren sind Mischungen kompletter Zelllysate aus HP- und NP-Organismen in den verschiedensten prozentualen Anteilen anwendbar. In derartigen Gemischen ließen sich verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten einstellen, so dass beispielsweise die Akkumulation eines oder mehrerer Zwischenprodukte möglich wird (Fig. 2C). Eine weitere Ausführungsform stellt die Isolation von bestimmten HP-Komponenten aus einem HP-Zelllysate und die Entfernung oder zumindest Verarmung dieser Komponenten im NP-Lysate dar. Auf diese Weise können eine oder mehrer Reaktionen über Druckänderungen gestoppt und angefahren werden (Fig. 1 D). Letztendlich kann der Ersatz einer oder mehrere Komponenten sowohl im HP-Zelllysate als auch im NP-Zelllysate vorgenommen werden. In diesem Fall lassen sich eine Vielzahl von zyklischen Reaktionen durchführen. In analoger Weise lassen sich HP- und NP-Komponenten aus den jeweiligen Zelllysaten isolieren und anderen Grundmedien, die Zelllysate, oder auch künstlichen Kompositionen sein können, zumischen (Fig. 2 E). Auf diesem Wege lassen sich Gemische beliebig zusammenstellen, in denen die Reaktanten frei nach der

Vorauswahl HP- oder NP- aktiv sind, was vielfältig schaltbare Vorgänge in Bioreaktoren erlaubt.

Vorteile der Druckmodulation sind des Weiteren die Synchronisation von Reaktionsfolgen sowie das Stoppen und Anfahren derselben, beispielsweise zum Auskoppeln von Reaktionsprodukten aus dem Reaktionszyklus.

Druck-PCR

Ein weiteres spezielleres Ausführungsbeispiel stellen PCR-ähnliche Systeme in druckgesteuerter Form dar. Zwischen den einzelnen Stufen, Annealing, Polymerase-Reaktion und Einzelstrangerzeugung, werden keine Temperaturänderungen mehr vorgenommen, sondern lediglich der Druck wie oben beschrieben geändert. Eine Variante ist in Fig. 3 schematisch dargestellt. Wird ein HP-Primer und eine HP-Polymerase sowie eine NP-Helicase verwendet, kann der gesamte Duplizierungszyklus über periodische Druckänderungen gefahren werden. Dies setzt voraus, dass man das Aufschmelzen der Doppelstränge durch Erwärmen eliminiert, was durch das Einfügen der Helicase möglich ist. Zum Durchlaufen des Zyklus wird zyklisch von NP auf HP und zurück geschaltet. Da Druckänderungen technisch sehr leicht steuerbar sind und schnell erfolgen können, kann auch mit kleinsten Mengen oder zum anderen in großen Volumina gearbeitet werden. Gerade große Volumina sind für das Thermocycling problematisch.

Biocomputer

Biocomputer auf der Basis von Makromolekülreaktionen, z.B. über DNA-Replikation, wurden bereits im Grundansatz experimentell demonstriert. Über die Verwendung von HP- und NP-Komponenten lassen sich a) logische Operatoren, b) Speichereinheiten als auch c) ein Grundtakt, mit dem die Reaktionen gestartet und gestoppt werden können, realisieren. In Fi-

Fig. 4 ist das Prinzip eines derartigen Grundelements, eines Tristate-Elements, dargestellt. In einer Membran befinden sich hierfür in gleichem Verhältnis Iontentransporter für Anionen als auch für Kationen. Die einen sind HP- die anderen NP-aktiv. Wird dieses System mit HP beaufschlagt, wird die Membran stark positiv geladen, bei NP hingegen negativ. Dieses binäre Prinzip kann durch weitere Druckwerte dazwischen auf Tristate oder Multistate erweitert werden. Über Kaskadierung lassen sich Verstärkersysteme aufbauen.

Analog zu diesem Beispiel lassen sich weitere, im Prinzip alle für einen Biocomputer erforderlichen Grundelemente realisieren.

Membrankompositionen

Ein weiteres Anwendungsbeispiel stellen Membransysteme auf der Basis von Biomembranen aber auch künstlichen Lipid- oder Feststoffmembranen dar. In diese können sowohl HP- als auch NP-Makromoleküle der verschiedensten Funktionen eingebracht werden (Fig. 5). Analog zum Bau von logischen Elementen, können auf diesem Weg sehr rasch schaltbare Sensorsysteme (umschalten von einem Sensor auf den anderen, Transportsysteme (Transport der Substanzen A_i) oder auch Kombinationen aus Ionsensoren mit Sensor oder Transportsystemen aufgebaut werden. In diesem Zusammenhang ist vor allem die chemisch, elektrisch, optisch oder auch viral induzierte Fusion lebender Zellen eine Möglichkeit der Mischung beider Komponenten (HP und NP). Hierfür sind Pärchen, Triplets oder höhere Fusionsprodukte aus HP- und NP-Zellen möglich. Über das Verhältnis der Fusionspartner (HP zu NP) lassen sich Mischungsverhältnisse erzeugen. Auch wenn derartige Fusionsprodukte wahrscheinlich nicht langfristig stabil und lebensfähig sind, eignen sie sich doch für die Biosynthese und die zellfrei Biotechnologie.

Energiequellen

Nachteilig an biologischen Energiequellen ist der stets bei physiologischer Temperatur ablaufende Stoffwechsel. Insbesondere energiereiche Moleküle werden daher abgebaut oder in der Konzentration reduziert bzw. reagieren unerwünscht mit anderen Komponenten. Da man Biobatterien in einem breiten physiologischen Temperaturbereich benutzen möchte, wäre es hilfreich, bei Nichtnutzung der Energie, die Reaktionen zu stoppen. Zudem sollten die üblichen Lade- und Pflegeprozesse abgekoppelt werden können. Dies ist über die Verwendung von zyklischen HP/MP/NP-Reaktionselementen möglich. Nur wenn das System in einem dieser Modi oder einem permanenten Wechsel zwischen HP und NP oder auch MP betrieben wird, kann Energie entnommen werden. In Figur 6 ist ein Beispiel einer auf solchen Komponenten beruhenden regenerierbaren Biobatterie formal gezeigt. Das System besteht aus drei Kompartimenten (I, II, III), die durch jeweils eine Membran voneinander getrennt sind (gepunktete vertikale Linien). In den Membranen befinden sich druckabhängige Transporter (T), die eine Komponente (A) vom Kompartiment I nach II und zurück, sowie eine Komponente (B) von Kompartiment I in III und zurück befördern können. Im Zentralraum (Kompartiment I) findet eine chemische oder lichtgetriebene zyklische HP-Reaktion statt. Die Komponente (A) bzw. (B) wird in einen geladenen Zustand überführt oder anderweitig angeregt, so dass sie Energie abgeben können. Dieses Kompartiment wird von Zeit zu Zeit neu mit Reaktantengemischen befüllt (chemisches Laden der Batterie). Nur bei HP werden die energiereichen oder geladenen Reaktanten von I nach II bzw. III durch die Membran transportiert. Nur bei NP können sie in der energieärmeren Form (A, B) zurück transportiert werden. Die Auskopplung der Energie erfolgt in Kompartiment II und III jeweils über eine Reaktion (K) die eine NP-Charakteristik zeigt. Die Ladungsübergabe erfolgt letztendlich wie bekannt auf Elektroden (El. 1 und 2), an denen die

Potentialdifferenz abgegriffen werden kann. Alle HP-Reaktionen sind mit hellen Pfeilen, alle NP-Reaktionen mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Im Einzelnen lassen sich die folgenden Modi fahren:

a) „Laden“ = HP:

Nur die HP-Reaktionen laufen ab. Angeregtes A und angeregtes B werden im Kompartiment I gebildet und nach Kompartiment II bzw. III transportiert. Dort kann jedoch keine Auskopplung der Energie erfolgen. Folglich werden A* und B* in II und III angereichert, was einem Ladevorgang entspricht.

b) „Arbeitsbetrieb“ = MP oder zyklischer Wechsel zwischen HP und NP:

Wechselt man beständig zwischen HP und NP oder wählt man MP, einen Mitteldruck an dem alle Reaktionen mit ausreichender Effektivität ablaufen, dann liefert das System Strom, regeneriert sich dazu noch gleichzeitig. Die Regeneration und der Transport der Komponenten speist sich aus dem eingebrachten Potential der Ausgangskomponenten. Eine Zelle muss bekanntlich von Zeit zu Zeit spaltbare Grundkomponenten aufnehmen und Abbauprodukte heraus transportieren. Dies ist in analoger Weise auch hier der Fall und durch die senkrechten breiten schraffierten Pfeile veranschaulicht. In diesem Modus laufen alle Prozesse ab, die Dauer der Energiebereitstellung ist optimal.

c) „Entladen“ = NP :

Betrieibt man das System im NP-Modus, kann einmal der in den Kompartimenten II und III angereicherte Energieanteil mit maximaler Effizienz ausgekoppelt und an die Elektroden gebracht werden. Die Reaktanten A und B werden auch zurück in das Kompartiment I transportiert. Alle anderen Vorgänge stehen jedoch. Dies entspricht einem einmaligen Entladen, allerdings mit besonders hoher Lastfähigkeit. Da die HP-Reaktanten A und B bei NP entladen werden, ist diese Reak-

tion bei NP nicht optimal. Da ggf. im System Reaktionswärme frei wird, ist dies für das Entladen einer Batterie mit hoher Kapazität sogar günstig (innere Kurzschlussfestigkeit).

Es sollte noch angemerkt werden, dass es sich nicht um das einfachste mögliche Batteriesystem handelt. So kann das System auch ohne Rücktransport zum einmaligen Nutzen der im Kompartiment I eingebrachten Reaktanten aufgebaut werden. Des Weiteren genügen zwei Kompartimente, wenn man eine der Elektrodenreaktionen in Kompartiment I ablaufen lässt.

Dekontamination chemischer Synthesesysteme

In analoger Weise lassen sich Kontamination und Dekontamination durch Druckwechsel und durch das Stoppen der Reaktionsketten und erneute Anfahren verringern oder beseitigen.

Lichtkomplexe unter HP und NP

Als weiteres Anwendungsbeispiel sind druckabhängige lichtgetriebene Prozesse zu nennen.

Im NP-Bereich gibt es eine Vielzahl von Rezeptor- und Energieumwandlungssysteme, die NP-optimiert arbeiten. Bei HP ist dies nicht der Fall. Andererseits sind aus der Tiefsee chemolumineszente Reaktionen und Reaktionskomponenten bekannt, wozu auch HP-Rezeptorsysteme gehören. Auch hier lassen sich wieder in analoger Weise HP- und NP-Komponenten mischen oder räumlich getrennt anordnen, z.B. um schaltbare Sensoren und zyklische Energieeinkopplung zu ermöglichen. Ein Anwendungsfeld bilden auch die Reaktionen im Kompartiment I der Biobatterien (Fig. 6).

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Steuerung einer chemischen Reaktion mittels Druck unter Verwendung von hochdruck-optimierten Biokomponenten, wobei eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten, welche nebeneinander oder räumlich getrennt voneinander vorliegen können, verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokomponenten ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von 11 bis 200, insbesondere 30 bis 200 MPa, und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa aufweisen.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Biokomponenten aus der Gruppe aus biologischen Makromolekülen, Molekülaggregaten, Organellen, Zellen oder Zelllysaten ausgewählt sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Biokomponenten biologische Katalysatoren, insbesondere Enzyme und Coenzyme, Membrankomponenten, Proteine oder Zucker umfassen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokomponenten von einem Tiefseeorganismus oder einer daraus erhaltenen Zellkultur stammen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der chemischen Reaktion um eine enzymatische Reaktion, z.B. eine PCR-Reaktion oder eine andere Reaktion zur Vervielfältigung oder Manipulation von Nukleinsäure, handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion durch eine Druckänderung eingestellt werden kann.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Reaktion durch eine Druckänderung an- oder abgeschaltet werden kann.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Abschaltung zur Entnahme von Reaktionsprodukten oder Entnahme/Zufuhr von Reaktionspartnern genutzt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass periodische Druckänderungen vorgenommen werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass Druckänderungen vorgenommen werden, die bestimmten vorgegebenen Funktionen, z.B. Funktionen mit sinusförmigen, rampenförmigen, rechteckigen oder trapezförmigen Verläufen, folgen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere definierte verschiedene Druckzustände realisiert werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der Druckzustände einen mittleren

- Druck, vorzugsweise in einem Bereich von 11 bis 30 MPa, umfasst und zusätzlich für diesen mittleren Druck optimierte Biokomponenten verwendet werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine Temperatursteuerung erfolgt.
 15. Zusammensetzung von Komponenten, insbesondere zur Durchführung mindestens einer chemischen Reaktion, die eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten, welche nebeneinander oder räumlich getrennt voneinander vorliegen können, umfasst.
 16. Zusammensetzung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokomponenten ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von 11 bis 200, insbesondere 30 bis 200 MPa, und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa aufweisen.
 17. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Biokomponenten aus der Gruppe aus biologischen Makromolekülen, Molekülaggregaten, Organellen, Zellen oder Zelllysaten ausgewählt sind.
 18. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-17, dadurch gekennzeichnet, dass die Biokomponenten biologische Katalysatoren, insbesondere Enzyme und Coenzyme, Membrankomponenten, Proteine oder Zucker umfassen.
 19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-18, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokompo-

nenten von einem Tiefseeorganismus oder einer daraus erhaltenen Zellkultur stammen.

20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-19, dadurch gekennzeichnet, dass sie vollständige oder partielle Fusionen von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Zellen enthält.
21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-20, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der chemischen Reaktion um eine enzymatische Reaktion, z.B. eine PCR-Reaktion oder eine andere Reaktion zur Vervielfältigung oder Manipulation von Nukleinsäure, handelt.
22. Verwendung einer Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten zur Steuerung einer chemischen Reaktion mittels Druck.
23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokomponenten ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von 50 bis 200 MPa und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa aufweisen.
24. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-14 oder der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 15-21 zur Herstellung und/oder zum Betrieb eines durch Druck steuerbaren Systems.
25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den durch Druck steuerbaren System um ein System zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen, ein Transportsystem, ein System zur Erzeugung,

Speicherung oder Umwandlung von Energie, ein Membransystem, einen Sensor, oder einen Schalter handelt.

26. System, welches eine Kombination von hochdruck-optimierten und niederdruck-optimierten Biokomponenten enthält, mit mehreren einstellbaren Druckzuständen, wobei die verschiedenen Druckzustände jeweils einen weiteren Parameter des Systems bestimmen.
27. System nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die hochdruck-optimierten Biokomponenten ein funktionelles Optimum bei einem Druck im Bereich von 30 bis 200 MPa und die niederdruck-optimierten Biokomponenten ein Optimum bei einem Druck im Bereich von 0,1 bis 10 MPa aufweisen.
28. System nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass der weitere Systemparameter eine bestimmte Ladung, Konformation, einen bestimmten Informations- oder Energiezustand etc. von Systemkomponenten umfasst oder repräsentiert.
29. System nach einem der Ansprüche 26-28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein System zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen, ein Transportsystem, ein System zur Erzeugung, Speicherung oder Umwandlung von Energie, ein Membransystem, einen Sensor, oder einen Schalter handelt.
30. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1-14, umfassend
 - eine Synthesekammer (1)
 - ein Druckerzeugungssystem (2),

- mindestens einen Zufluss (3), und
 - mindestens einen Abfluss (4).
31. Vorrichtung nach Anspruch 30, welche ferner noch
- Sensoren (5), und
 - eine Einrichtung (6) zur Erfassung und Verarbeitung der von den Sensoren erhaltenen Daten umfasst.
32. Vorrichtung nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Synthesekammer zwei verstellbare Wände (11,13) umfasst, deren Abstand mit einem Abstandssystem (12) regelbar ist, und das Druckerzeugungssystem (2) zwei Verstellelemente (24, 25), die an einem Spannungsgenerator (211) angeschlossen sind, sowie einen stabilen Rahmen (212) als Gegenlager umfasst.
33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30-32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Verstellelementen um Piezoelemente handelt.
34. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30-33, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Wand der Synthesekammer transparent ist.
35. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 30-34, dadurch gekennzeichnet, dass die verstellbaren Wände die untere und die obere Begrenzung der Synthesekammer bilden und der maximale Abstand der verstellbaren Wände geringer ist als die Länge und Breite der verstellbaren Wände.

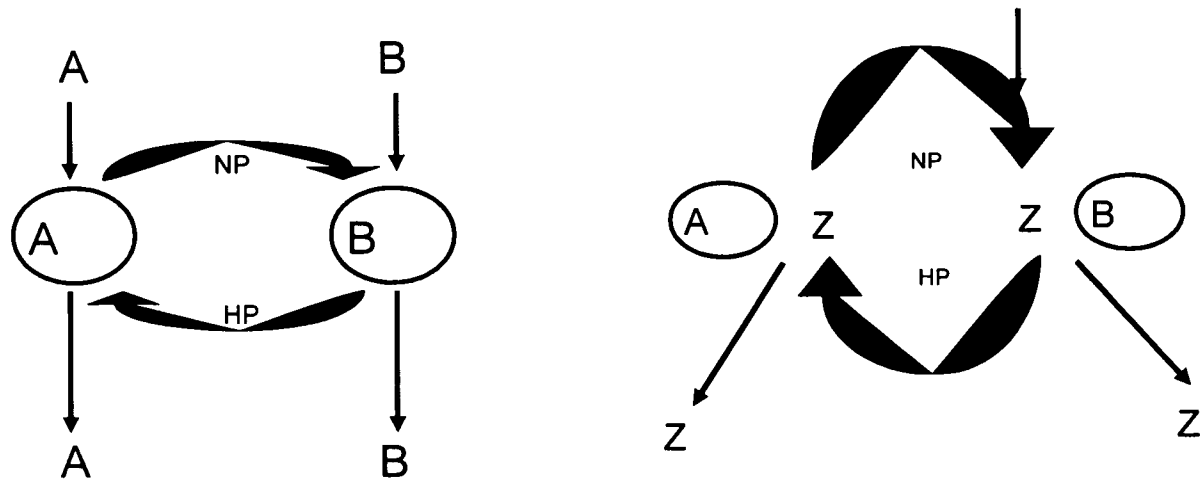


Fig. 1

2/13

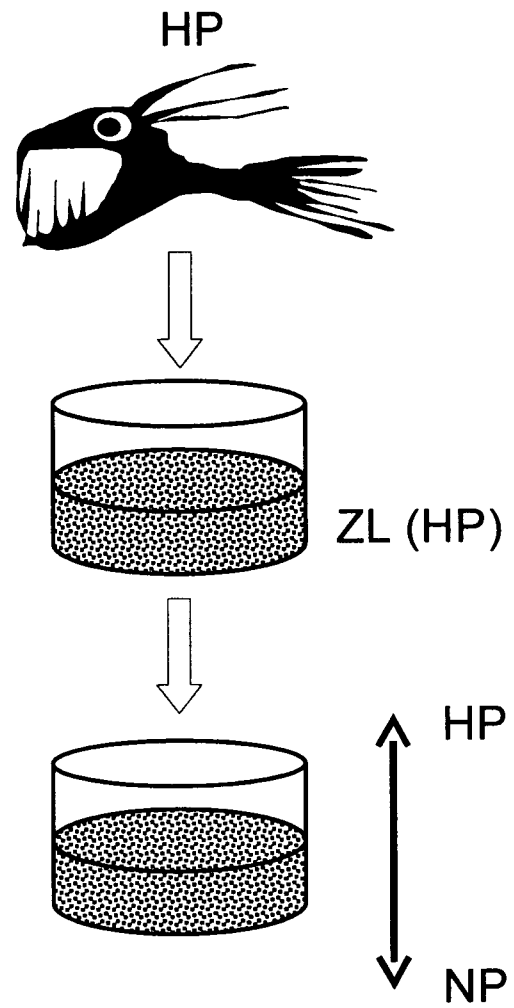


Fig. 2A

3/13

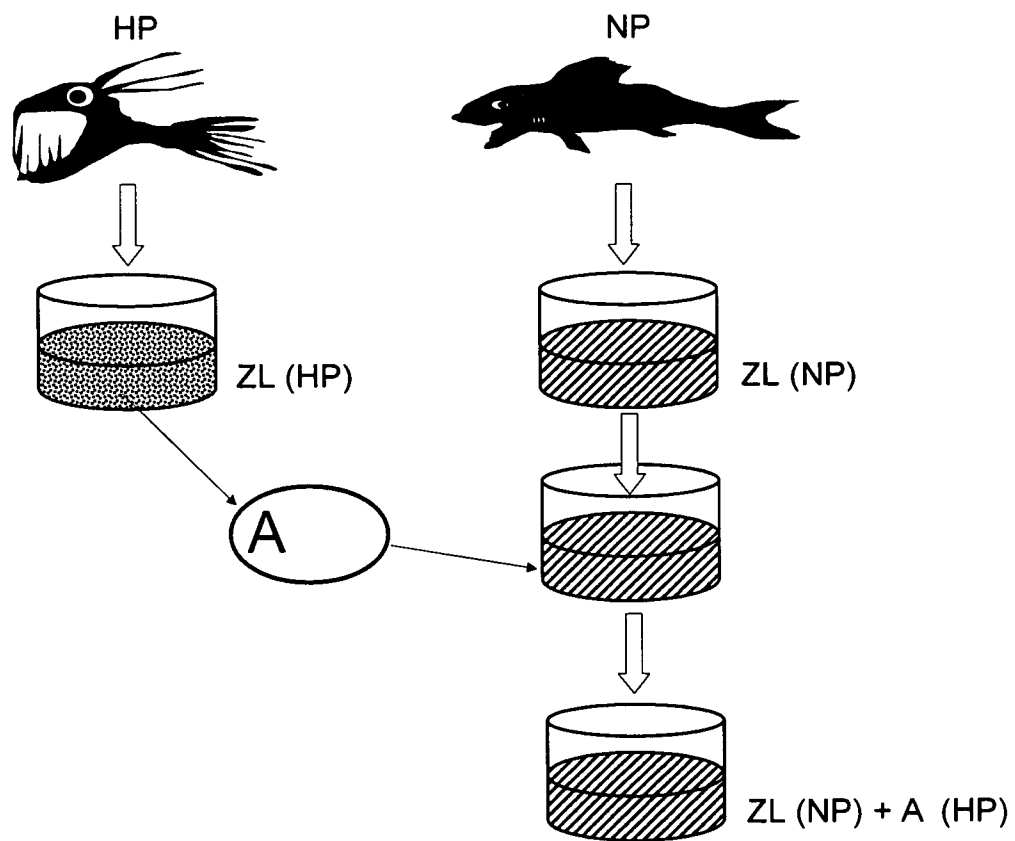


Fig. 2B

4/13

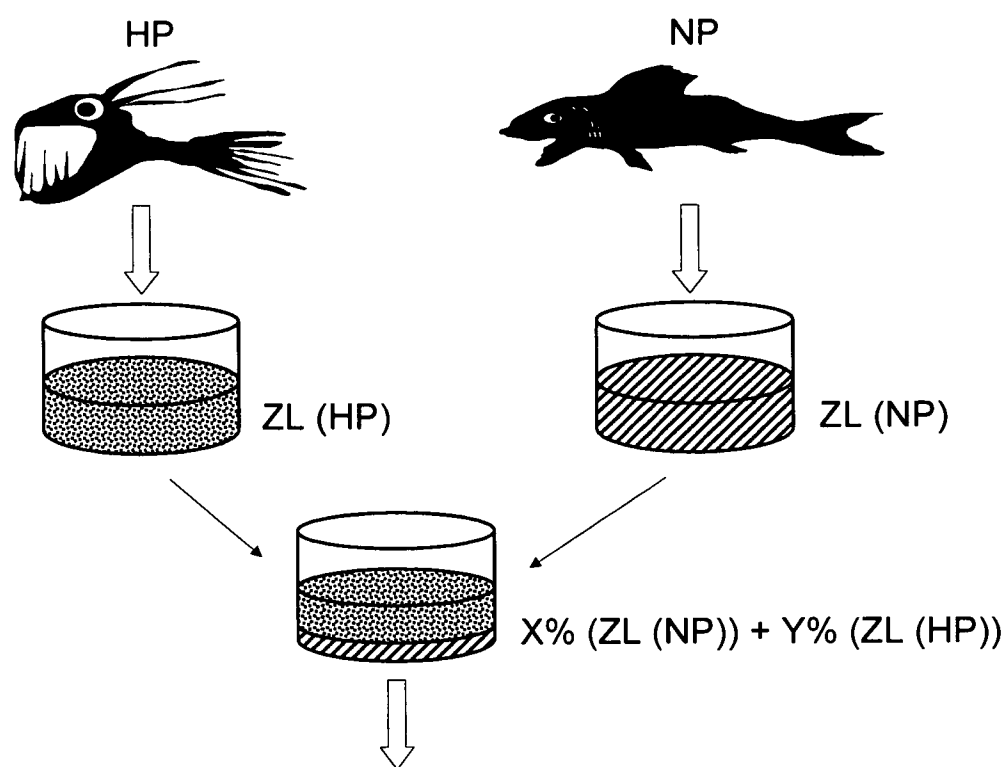


Fig. 2C

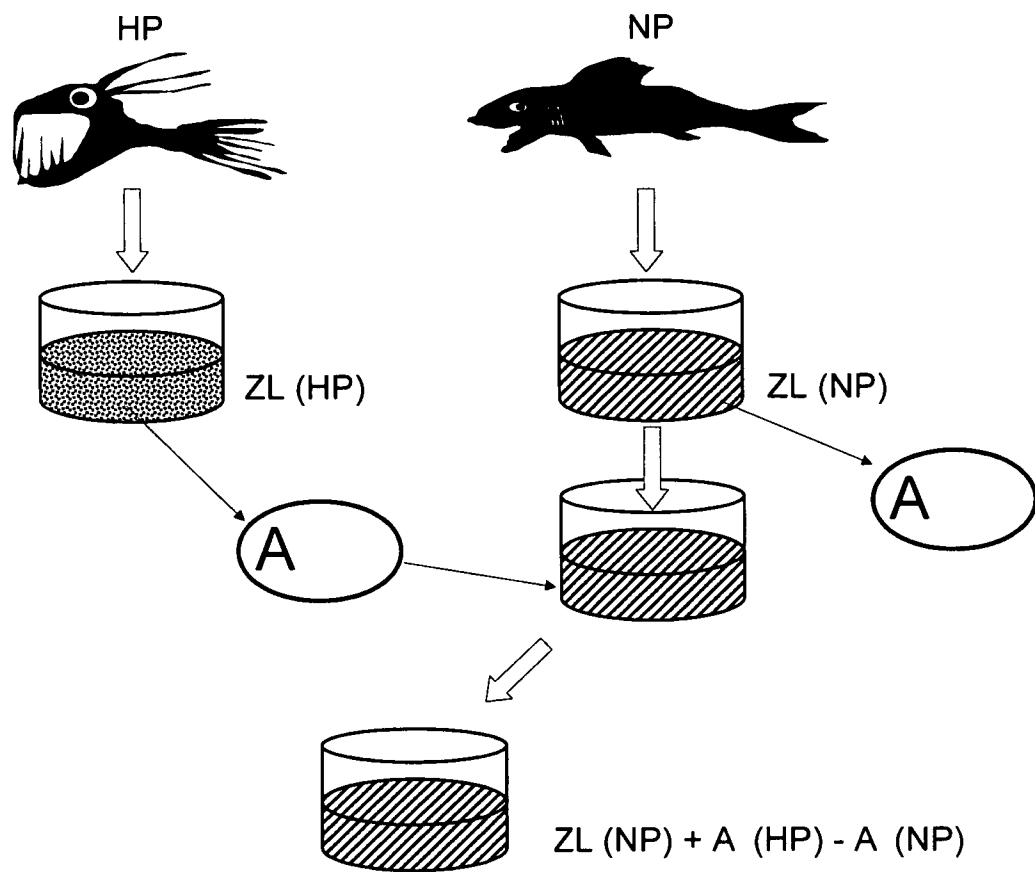


Fig. 2D

6/13

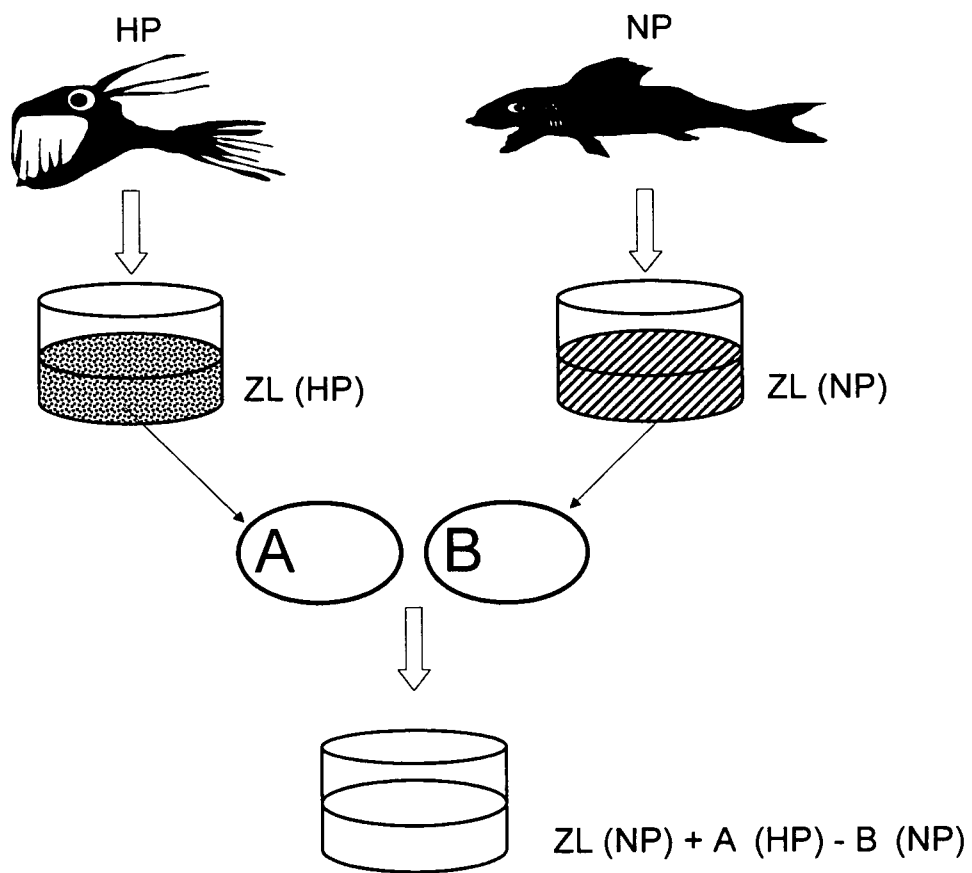


Fig. 2E

7/13

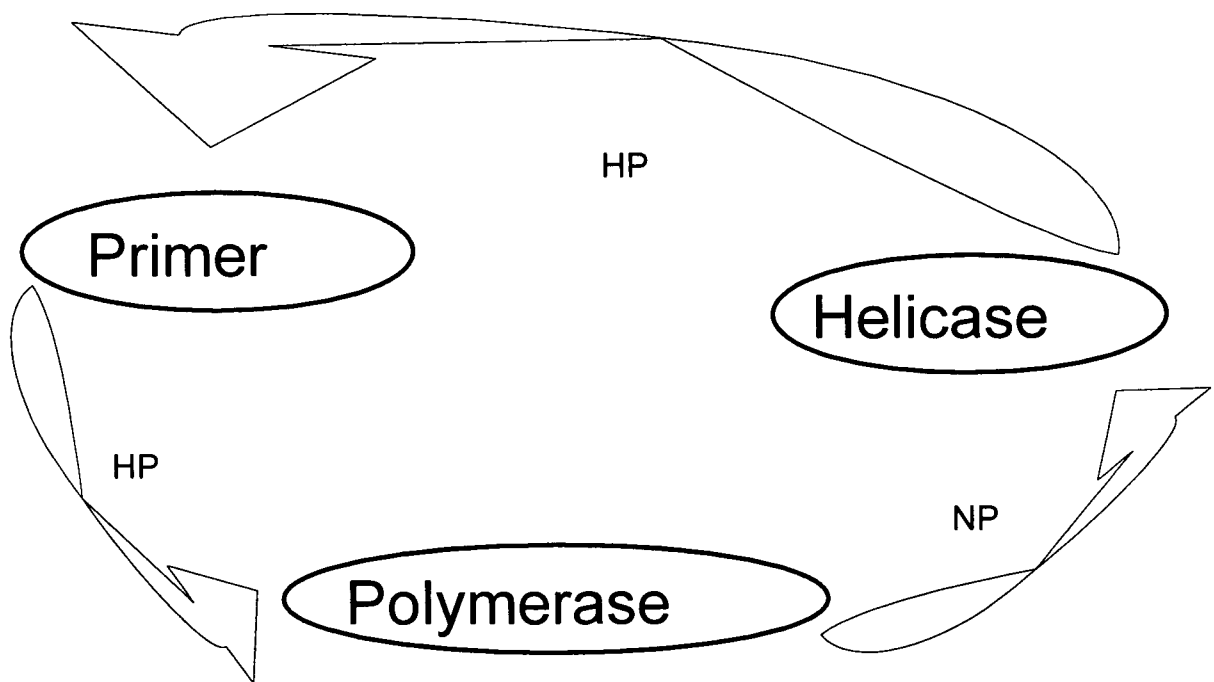


Fig. 3

8/13

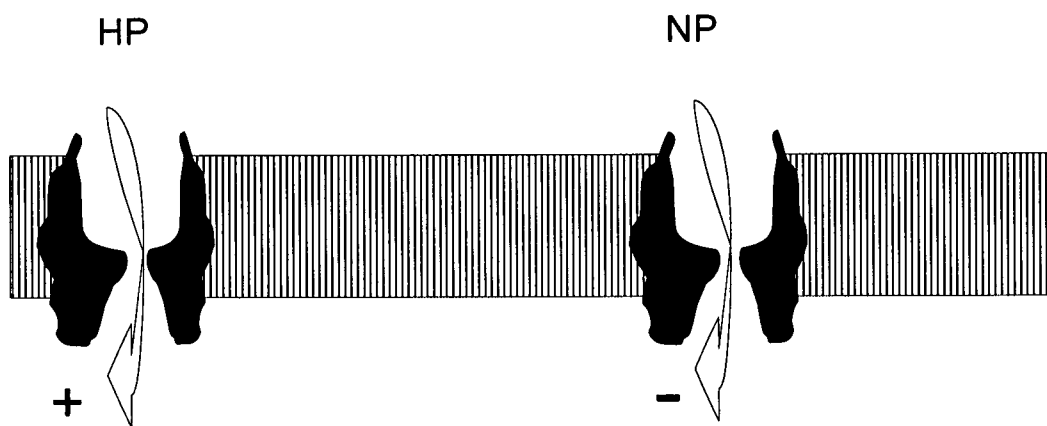


Fig. 4

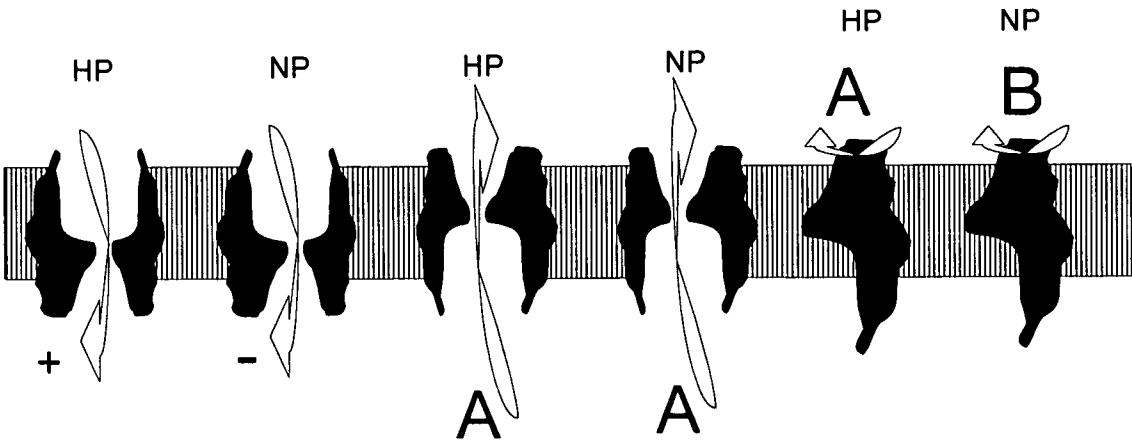


Fig. 5

10/13

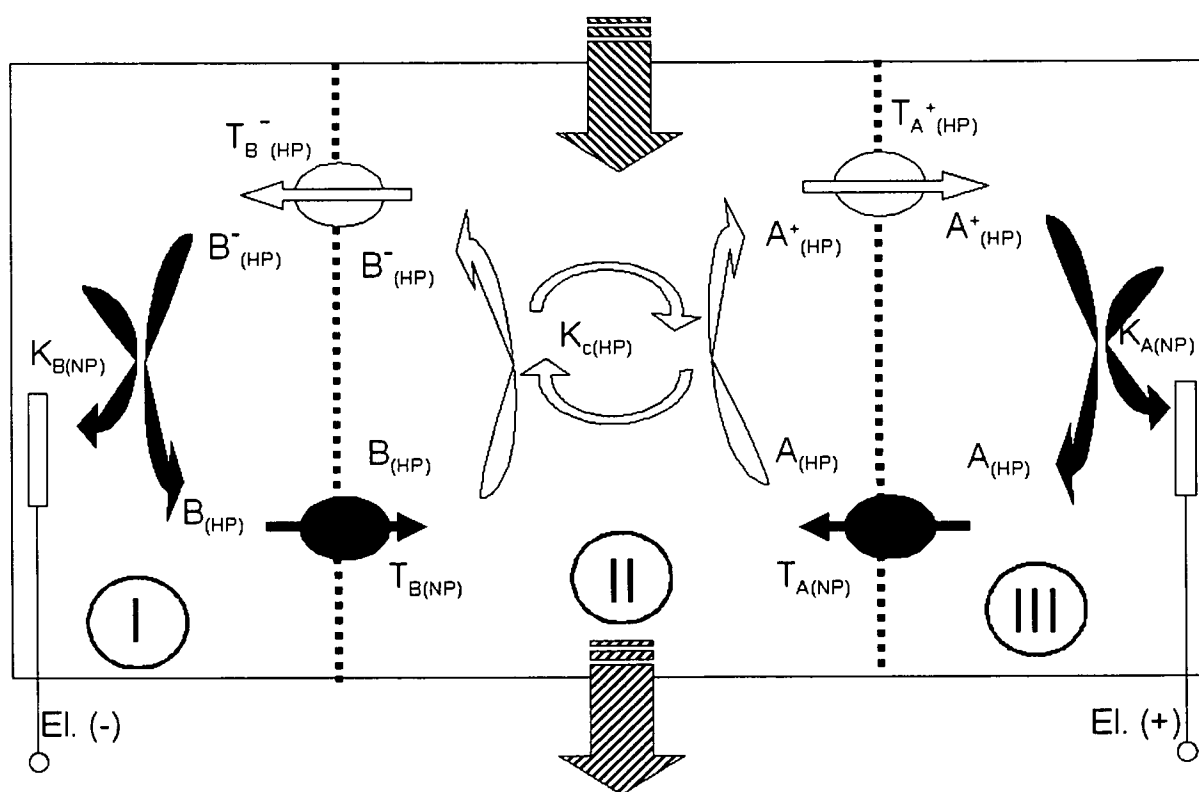


Fig. 6

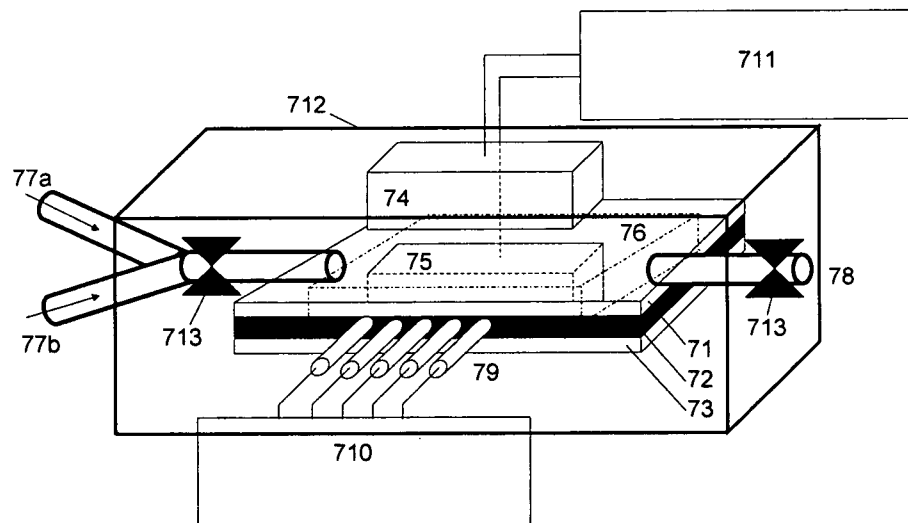
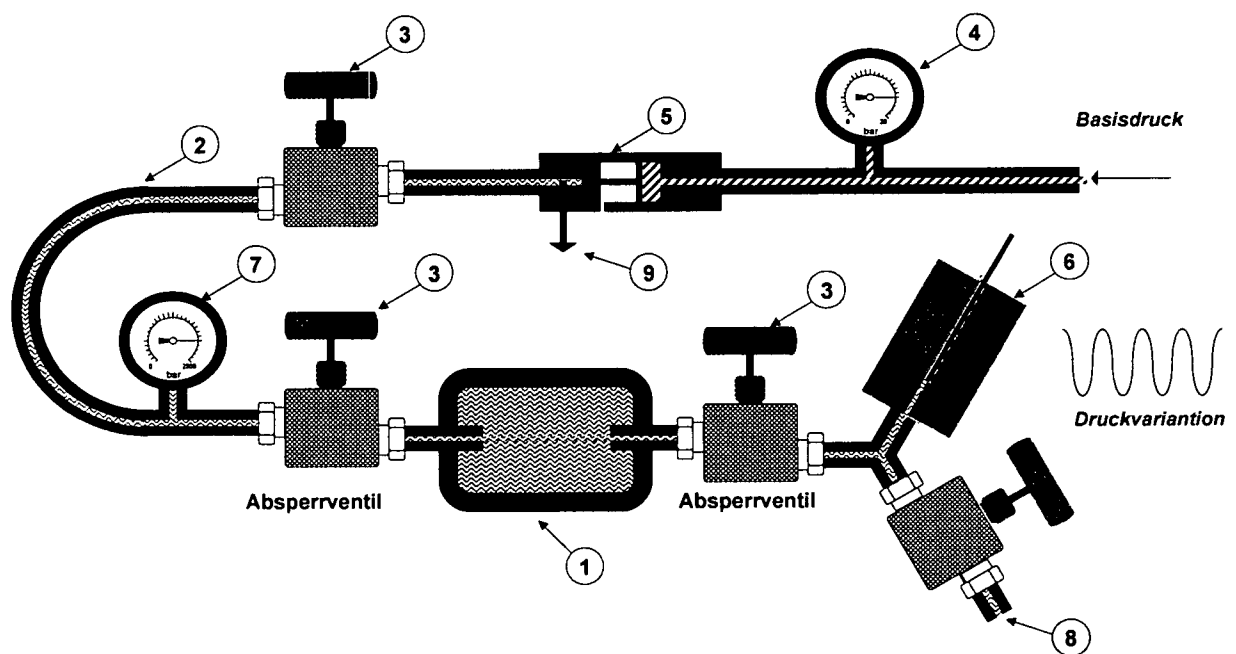


Fig.7

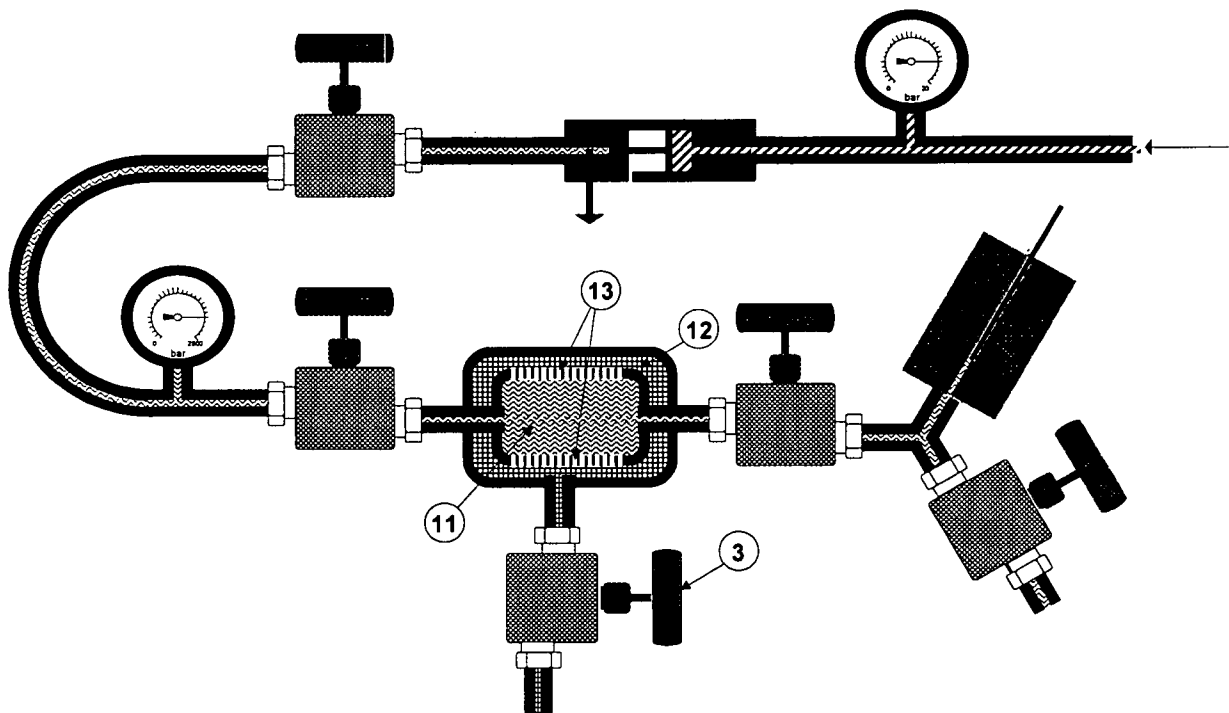
12/13



Schema 1: Reaktionskammer mit Druckperipherie

Fig. 8

13/13



Schema 2: Reaktionskammer mit Diffusionsöffnungen

Fig. 9