Zeitschrift: Bulletin Electrosuisse
Herausgeber: Electrosuisse, Verband für Elektro-, Energie- und Informationstechnik
Band: 97 (2006)
Heft: 19

Artikel: Schaltungsentwurf auf DNA-Ebene
Autor: Nolde, Kristian / Panke, Sven
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-857727

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Schaltungsentwurf auf DNA-Ebene

Synthetische biologische Schaltungen

Heilung gegen unbesiegte Krankheiten und fast unerschöpfliche Energievorkommen verspricht die moderne Gentechnik. Doch wie können solche Pläne verwirklicht werden? Die synthetische Biologie ist ein möglicher Ansatz. Sie will die Prinzipien, die das Ingenieurwesen so erfolgreich gemacht haben, wie die Standardisierung, die funktionellen Abstraktionen oder die Trennung von Fabrikation und Design, in die Biotechnologie integrieren. Letztendlich soll es möglich werden, neue biotechnologische Funktionen nach dem Baukastenprinzip mit einer hohen Erfolgswahrscheinlichkeit aus vorgefertigten, modularen Teilen in lebende Zellen einzubauen.

Seit Watson und Crick am Anfang der 50er-Jahre die Doppelhelixstruktur der DNA[1)] entdeckten und damit das Geheimnis ihrer Funktion entschlüsselten, ist wohl kaum ein anderes Molekül derart in den Mittelpunkt von Forschung, Me-

Kristian Nolde, Sven Panke

dien und Gesellschaft gerückt (Bild 1). Die Tatsache, dass die DNA zentral ist für die Funktionen des Lebens an sich, macht wohl diese ganz besondere Faszination aus.

Was aber wäre, wenn man nicht mehr der Evolution den Zusammenbau der DNA überlässt, sondern eine eigene DNA erstellt, die ganz neue Funktionen übernimmt? Man erhofft sich so Fortschritte bei der Heilung von Krankheiten wie Krebs und Aids oder technische Lösungen, z.B. biologische Supercomputer oder die Produktion von Wasserstoff oder Methan mittels modifizierter Bakterien. All diesen Herausforderungen hat sich die Gentechnik und nun auch die synthetische Biologie angenommen.

Biologischer Hintergrund

Doch wie funktioniert dieser Bauplan der Zellen und was muss getan werden, um diesen zu ändern? Jede Zelle beinhaltet (mindestens) ein DNA-Molekül, ein Chromosom, auf dem alle Informationen zum Aufbau und zur Funktionsweise der Zelle in Form von Genen kodiert sind. Bei den Genen handelt es sich um bestimmte DNA-Abschnitte, die Informationen zum Aufbau von Proteinen und anderen Molekülen enthalten, die bei Prozessen wie Proteinsynthese oder Regulation des Stoffwechsels in der Zelle nötig sind.

Die Information in den Genen ist dabei über die Abfolge von Basenbausteinen auf der DNA bestimmt. Bei Bedarf werden diese Informationen ausgelesen. Dazu dockt ein Proteinkomplex, die RNA-Polymerase[2)], an Bindungsstellen an, den sogenannten Promotoren, und schreibt die Basenabfolge in eine chemisch weniger stabile Kopie aus RNA um. Diese Kopie wird dann für Zellbetrieb und den Aufbau von Proteinen genutzt; diese Proteine können wiederum den Abschreibevorgang anderer Gene beeinflussen. Wenn in das Chromosom nun zusätzliche, ggf. künstlich synthetisierte Gene eingefügt sind, können diese neue Funktionen in der Zelle übernehmen. In kleinerem Massstab ist dies seit den 70er-Jahren möglich.

Synthetische Biologie

Um einer Zelle nun aber in grösserem Massstab gezielt neue Funktionen zu geben, sind zwei Dinge notwendig. Erstens müssen die technischen Möglichkeiten existieren, in entsprechender Länge neue DNA-Moleküle *in vitro,* also im Reagenzglas, herzustellen. Dies ist inzwischen gelungen, und DNA kann chemisch synthetisiert werden, mit einer Moleküllänge von bis zu etwa 32 000 Basenpaaren (das entspricht ungefähr 30 neuen Genen). Zum Zweiten muss aber auch ein Designprozess existieren, der Modellierungs- und Simulationstechniken einschliesst und es erlaubt, ausgehend von einer Funktionsbeschreibung die einzufügende Basensequenz zu bestimmen, also den neuen «Sinn» in das Molekül einzubauen.

Entwicklung und Anwendung dieses Designprozesses ist Aufgabe der jungen Disziplin der synthetischen Biologie. Ziel ist, die Komplexität, ähnlich der Elektrotechnik, durch Abstraktionsebenen beherrschbar zu machen. Analog zu den elektrotechnischen Bausteinen sollen biologische Bausteine definiert werden [1]. Diese sollen in der Zukunft genau definierte Eigenschaften mit standardisierten Ein- und Ausgängen besitzen und so zu komplexeren Schaltungen zusammengesetzt werden können.

Im Übertragenen stellt beispielsweise das Chromosom die Gesamtheit einer

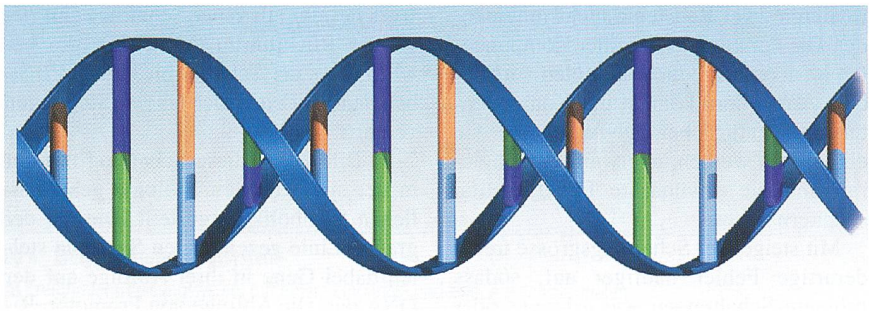


Bild 1 Die Doppelhelixstruktur der DNA

Schaltung dar, die zerlegt werden kann in funktionale Gruppen, die auf DNA-Ebene durch Gensequenzen repräsentiert werden. Ein- und Ausgangssignale dieser Gruppen sind typischerweise «Raten», das sind Häufigkeiten, mit denen RNA-Polymerase-Moleküle sich an der DNA entlang bewegen auf dem Weg zum Abschreiben eines Gens. Die einzelnen Bauelemente einer Schaltung entsprechen dann den Genen. Die Basensequenz der Gene bestimmt deren Charakteristika und damit die Topologie der Schaltung.

Für das Design eines Schaltkreises, z.B. eines Zählers, reicht es dann im idealen Fall, die einzelnen Baugruppen (z.B. Flip-Flops) auszuwählen und korrekt miteinander zu verschalten, so wie dies in der Schaltungstechnik Standard ist. Das Ergebnis des Designs ist eine Basensequenz, die beispielsweise in das Chromosom eines Bakteriums eingefügt werden kann. Diese zusätzliche DNA könnte nun eine Zählfunktion übernehmen, die ein Baustein eines Biocomputers werden könnte.

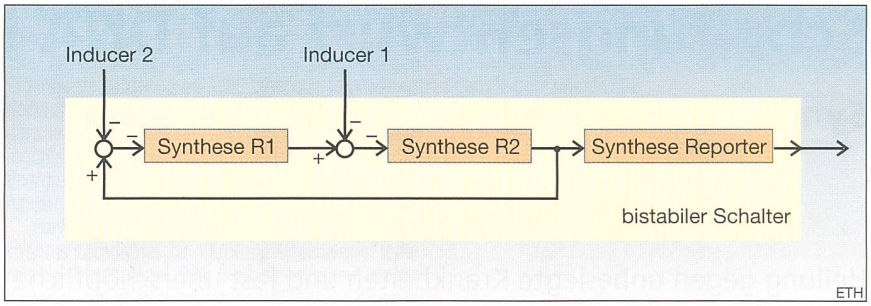


Bild 2a Blockdiagramm für einen bistabilen Schalter

Durch die Inducer 1 und 2 können die Syntheserate für die Proteine R2 und R1 gesteuert werden. Die Rückführung bewirkt, dass der Schalter ohne Zugabe von Inducer 1 oder 2 stabil bleibt.

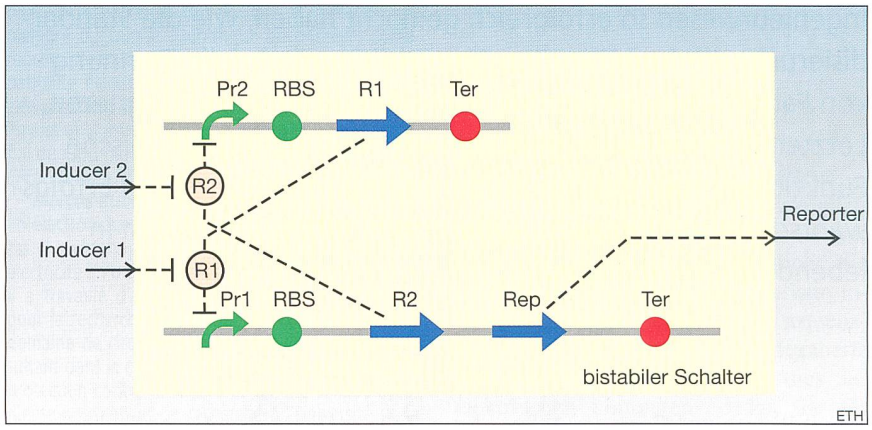


Bild 2b Bistabiler Schalter mit den in der synthetischen Biologie üblichen Symbolen

Dargestellt sind die Promotoren (Pr1, Pr2) durch geknickte grüne Pfeile, die Ribosombindungsstellen (RBS) durch grüne Kreise, die Gene (R1, R2, Rep) durch blaue Pfeile und die Terminatoren durch rote Kreise. Die beiden Proteine R1 und R2 sind durch die beiden mit R1 und R2 beschrifteten Kreise dargestellt.

Probleme und Erfolge

Das vorgestellte Abstraktionsmodell stellt für den Moment sicher das Idealbild und Ziel der Forschung in der synthetischen Biologie dar. Einzelne Teile sind auf dem Weg zur Verwirklichung. So ist am Massachusetts Institute of Technology (MIT) eine Datenbank mit Informationen zu schon existierenden Komponenten, den sogenannten Bio-Bricks, entstanden.[3)]

In dieser Datenbank sind die Funktionen vorhandener Bausteine beschrieben und um Informationen zu Herkunft sowie um mit dem Baustein gesammelte Erfahrungen ergänzt. Für einige Bausteine sind auch quantitative Parameter abgelegt, beispielsweise wie stark ein Promotor als Bindungsstelle für Polymerase wirkt.

Von den dort vorgestellten Bauelementen kann eine Vielzahl – wie erwünscht – miteinander kombiniert werden. Teilweise treten jedoch Probleme auf; die gemachte Abstraktion scheitert, und aus oft ungeklärten Ursachen funktionieren zwei Bausteine nicht miteinander. Die Funktionsweise aller Komponenten ist noch lange nicht komplett verstanden. Ausserdem können die Komponenten mit natürlicher DNA, in die sie eingebettet werden, unerwartet interagieren und die erwünschte Funktionalität scheitern lassen.

Mit steigender Schaltungsgrösse treten derartige Fehler häufiger auf, sodass grössere Schaltungen wie Addierer oder Zähler bisher noch nicht realisiert wurden. Bereits konstruiert und auf DNA-Ebene implementiert ist aber ein einfacher bistabiler Schalter.

Bistabiler Schalter

Der Schalter wurde von Gardner et al. entworfen und im Jahr 2000 im Fachblatt Nature publiziert [2]. Das Ziel war ein Schalter, der nach dem Umschalten stabil in der neuen Position verharrt, bis er wieder zurückgeschaltet wird. Schalten bedeutet in diesem Zusammenhang eine diskrete Zugabe einer definierten Substanz (Inducer) zu den wachsenden Bakterien.

Die grundsätzliche Idee für den Entwurf besteht aus einer Schaltung mit negativer Rückführung (Bild 2a), die bewirkt, dass der Schalter bis zu den Zugaben stabil in einer der beiden Stellungen verharrt.

In Bild 2b ist diese Schaltung mit der in der synthetischen Biologie gebräuchlichen Symbolik dargestellt. Die auf der grauen Linie gezeichneten Symbole stellen dabei Gene in ihrer Abfolge auf der DNA dar. Die Abfolge von Promotor, Ribosombindungsstelle, Genen und Terminator ist typisch. Der Promotor steuert die Häufigkeit, mit der die nachfolgenden Gene durch die Polymerase ausgelesen werden und damit, welche Menge des zum Gen korrespondierenden Proteins letztendlich hergestellt wird. Dabei ist die Ribosombindungsstelle für die Übersetzung der RNA-Kopie in Protein an späterer Stelle nötig. Je häufiger ein Promotor «feuert», desto stärker ist er. An ihm kann aber auch das Abschreiben verhindert werden, wenn zum Beispiel regulierende Proteine an ihm angreifen und den Start des Abschreibens verhindern. Man spricht dann von Repression. So ist durch den kleinen Querbalken am Ende der Rückführung in Bild 2b eine negative Rückkopplung angezeigt. Ein aktives Gen R1 führt zur Produktion von Protein R1, und dieses wiederum reprimiert das Abschreiben des Gens R2 und des Reportergens, dessen korrespondierendes Protein den Zustand des Systems für uns sichtbar macht (Bild 3).

Die Schaltung funktioniert wie folgt: Durch Zugabe des Inducers 1 wird das Repressorprotein 1, dessen Synthese vom Gen R1 aus gesteuert wird, abgeschaltet. Es kann nun nicht mehr den Promotor 1

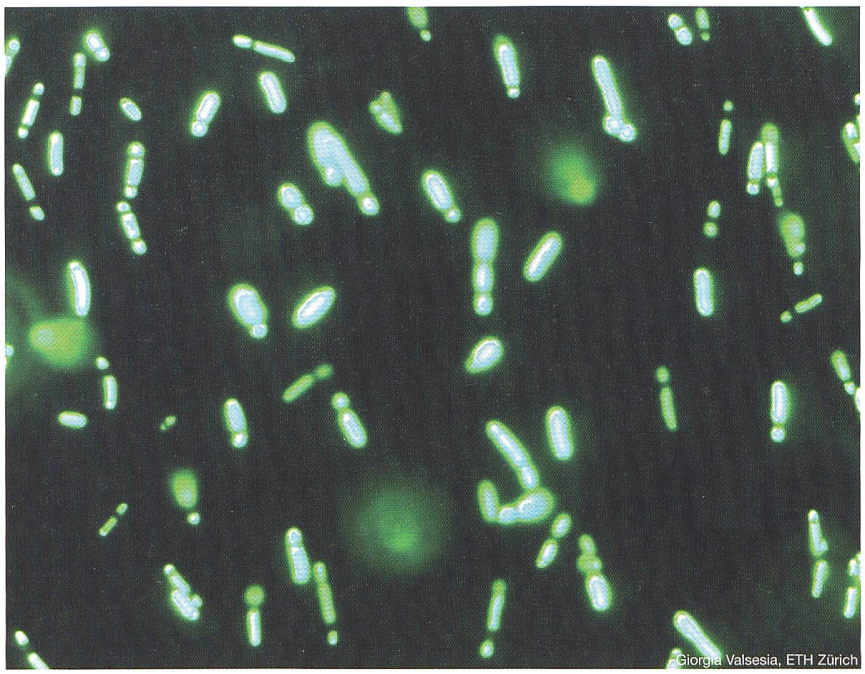


Bild 3 Grün fluoreszierende Escherichia-coli-Bakterien

Ausgangssignale der biologischen Systeme können mithilfe des Green Fluorescence Protein Gene sichtbar gemacht werden

reprimieren, sodass Gen R2 abgeschrieben und das korrespondierende Repressorprotein 2 erzeugt werden kann. Dieses wiederum reprimiert nun den Promotor 2 und verhindert die Synthese von Repressorprotein 1. Somit bleibt die Neusynthese von Repressorprotein 1 aus, der vorhandene Bestand zerfällt im Laufe der natürlichen Vorgänge in der Zelle, während Repressorprotein 2 laufend nachproduziert wird, da Promotor 1 von Natur aus «an» ist, bis er abgestellt wird. Der Zustand *Promotor 1 an, 2 aus* ist stabil implementiert. Erst durch Zugabe von Inducer 2 kann die Schaltung umgekehrt werden: Repressorprotein 2 wird abgestellt, Promotor 2 geht an, Repressorprotein 1 wird produziert und reprimiert Promotor 1. Auch Promotor 2 ist von Natur aus an, sodass der Zustand *Promotor 2 an, 1 aus* nun wieder stabil ist, bis durch erneute Zugabe von Inducer 1 wieder von aussen eingegriffen wird.

Von aussen betrachtet, ergibt sich ein System mit zwei Eingängen, Inducer 1 und Inducer 2, und einem Ausgang, dem Reporterprotein. Dabei kann das Gen für das Reporterprotein mittels der beiden Inducer an- und ausgeschaltet werden.

Natürlich handelt es sich bei den An- und Ausschaltvorgängen nicht um digitale Ereignisse, wie in der Funktionsbeschreibung suggeriert. Vielmehr ist das Ausgangssignal, der Reporter, durch seine Konzentration (Anzahl der Proteinmoleküle in der Zelle) gegeben. Hinzu kommt, dass die Aktivierungs- und Reprimierungsvorgänge Zeitkonstanten besitzen, die abhängig von den Rahmenbedingungen zwischen 15 Minuten und mehreren Stunden liegen können.

Eine genauere Beschreibung kann eine Modellierung mittels Differenzialgleichungen liefern, so wie dies auch bei analogen Schaltungen üblich ist. Das so gewonnene mathematische Modell kann dann zur Analyse des Entwurfs vor der Implementierung eingesetzt werden. Zu klären ist beispielsweise, ob in der Simulation dieses Modells überhaupt die beiden stabilen Zustände, An und Aus, erreicht werden können.

Für den vorgeschlagenen Schalter konnte prinzipiell die Funktionstüchtigkeit gezeigt werden. Gardner et al. haben darüber hinaus angeben können, für welche Werte der Parameter und Zeitkonstanten der Entwurf später funktionieren sollte. Diese Schaltung wurde in DNA übersetzt und funktionierte wie erwartet in Bakterien. Das funktionstüchtige Design des Schalters im Jahr 2000 stellte einen Meilenstein für die damals neue synthetische Biologie dar.

Zähler aus Bakterien

Eine – nicht triviale – Erweiterung des bistabilen Schalters ist die Konstruktion eines Zählers. Mit einem Zähler auf DNA-Ebene wäre ein Grundbaustein zur Realisierung eines Computers vorhanden und ein weiterer Schritt in Richtung eines Biocomputers getan. Auch ohne Rechenanwedung wäre ein Zähler in einem Bakterium für Biologen von Interesse, beispielsweise um zu verfolgen, wie häufig sich ein Bakterium geteilt hat.

Das Design dieses Zählers war das Ziel eines interdisziplinären Teams der ETH Zürich, mit fünf Studenten der Biologie und sieben der Elektrotechnik und Informatik. Ziel war ein System, das einen Eingang besitzt, an dem Ereignisse gezählt werden können. Nach jedem zweiten Ereignis sollte ein Ausgangssignal erfolgen.

Als Erstes wurde dieses System in zwei Subsysteme aufgeteilt, in ein Ereignisverarbeitungssystem und eine Speichereinheit für den Zustand. Im Ereignisverarbeitungssystem sollen Ereignisse jenseits einer bestimmten Intensität detektiert und in zwei einzelne, entgegengesetzte Signale aufgeteilt werden. Das eine Signal entspricht dabei einer Durchleitung des Eventsignals, wobei dieses

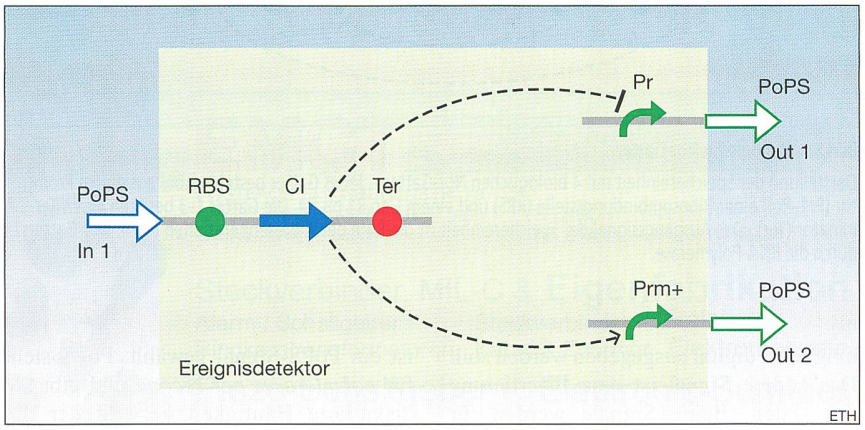


Bild 4 Ereignisverarbeitungssystem

Das Ereignisverarbeitungssystem mit einem Eingangs- und zwei Ausgangssignalen:
Vom Eingang her kommend liest die Polymerase entlang der Ribosombindungsstelle (RBS), dem Gen CI bis zum Terminator (Ter). Über das Protein CI wird der Promotor Pr reprimiert und Prm+ aktiviert.

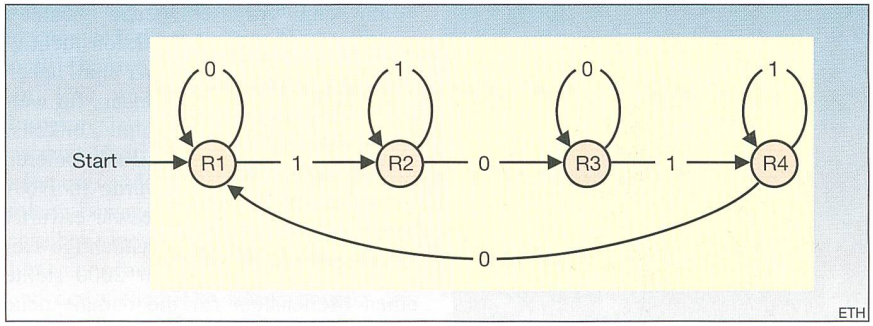


Bild 5a Funktionsweise der Speichereinheit (Zustandsautomat)

Die Zustände: *Noch kein Ereignis* (R1), *Ereignis einmal begonnen* (R2), *Ereignis einmal beendet* (R3), *Ereignis zum zweiten Mal begonnen* (R4), sind in den Kreisen gekennzeichnet. An den Pfeilen angetragen ist das Eingangssignal 1 oder 0, das die Zustandsänderungen herbeiführt.

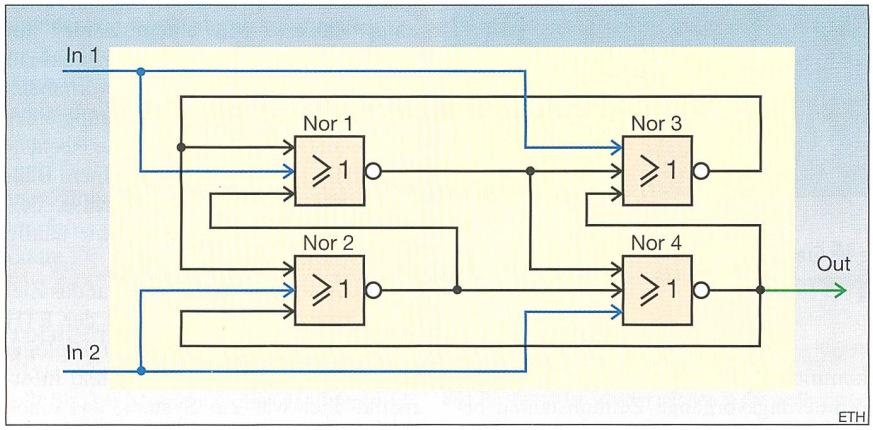


Bild 5b Speichereinheit aus 4 Nor-Gattern

Die Speichereinheit, bestehend aus 4 Nor-Gattern, mit zwei Eingangssignalen In 1 und In 2 sowie dem Ausgangssignal Out

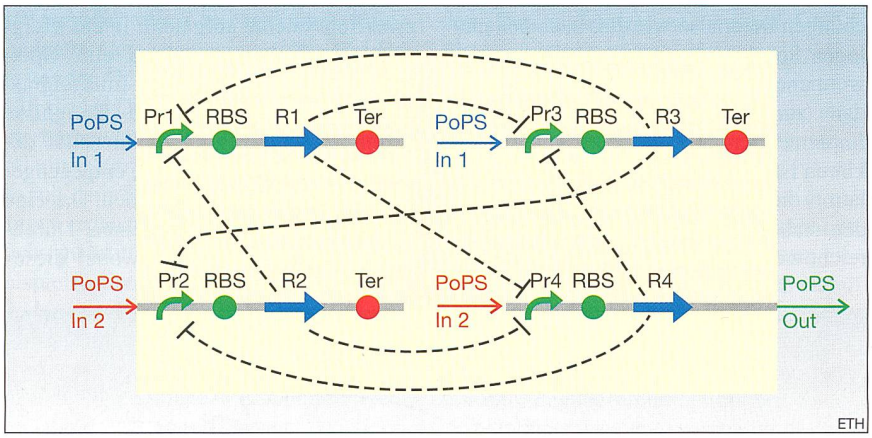


Bild 5c Biologische Nor-Gatter

Darstellung der Speichereinheit mit 4 biologischen Nor-Gattern. Jedes Gatter besteht dabei aus einem Promotor (Pr1–Pr4) einer Ribosombindungsstelle (RBS) und einem Gen R1 bis R4. Die Gatter 1–3 besitzen einen Terminator (Ter). Das Ausgangssignal der Speichereinheit ist die Rate der Ausleseoperationen des 4. Nor-Gatters durch die RNA-Polymerase.

möglichst digital ausgegeben werden soll. Das andere Signal ist eine Invertierung des ersten. Beide Signale werden für die Ansteuerung der Speichereinheit benötigt.

Das Design des Ereignisverarbeitungssystems ist in Bild 4 gezeigt. Als Eingang ist ein PoPS-Signal gewählt. PoPS steht für *polymerases per second* und gibt die diskutierte Häufigkeit an, mit der die RNA-Polymerase diese Stelle auf der DNA passiert. Durch eine hohe Anzahl an PoPS am Eingang wird also das Gen CI oft abgeschrieben, das resultierende Protein CI reprimiert den Promotor Pr und aktiviert (auch das ist mit Proteinen möglich) Prm+. So entstehen zwei entgegengesetzte PoPS-Ausgangssignale.

Der zweite Baustein, die Speichereinheit, nutzt die beiden Ausgangssignale des Ereignisverarbeitungssystems, um einen Zustand abzuspeichern. Die Zustände ihrer Abfolge nach sind: *Noch kein Ereignis* (R1), *Ereignis einmal begonnen* (R2), *Ereignis einmal beendet* (R3), *Ereignis zum zweiten Mal begonnen* (R4). Der Zustand *Ereignis zum zweiten Mal begonnen* wird als Ergebnis ausgegeben. Das zugrunde liegende Konzept kann dabei mit einem Automaten (Bild 5a), veranschaulicht werden.

Das gewählte Design entspricht dabei einer Verkettung von vier Nor-Gattern (Bild 5b). Diese sorgen dafür, dass nur ein Zustand im System exklusiv «an» sein kann. Aufgrund von unterschiedlichen Verzögerungen in den Signalwegen kann sichergestellt werden, dass bei den einzelnen Zustandswechseln die gewünschte Schaltsequenz R1→ R2 → R3 → R4 eingehalten wird.

Die Speichereinheit (Bild 5c) besteht aus vier DNA-Abschnitten (jeweils eine graue Linie mit den darauf angeordneten Bio-Bricks), die die Nor-Gatter darstellen. Die Eingangssignale der Nor-Gatter sind dabei die Anwesenheiten von Proteinen, die aus den Aktivitäten von je zwei Genen aus R1, R2, R3 und R4 hervorgehen, und eines der Ausgangssignale des Ereignisverarbeitungssystems. Die Gene und die Ausgangssignale sind dabei genau so gewählt, dass die Schaltung aus Bild 5b nachgebaut ist und so ein Entwurf für einen Zähler auf DNA-Ebene vorliegen sollte.

Ähnlich wie im Beispiel des einfachen Schalters wurde auch für den Zähler eine detaillierte Modellierung mittels Differenzialgleichungen durchgeführt, denn die einzelnen Signale sind in der Realität nicht digital (Bild 6). Ereignisverarbeitungssystem und Speichereinheit wurden modelliert, analysiert und simuliert. Die Ergebnisse bestätigten das prinzipielle Funktionieren des Designs. Die für das Modell angenommenen Parameter entstammen der Literatur und sollten realistisch sein.

Da das System bisher noch nicht zu Ende gebaut wurde, steht der Praxistest noch aus. Im Falle eines ersten Fehlschlags können die durchgeführten Analysen Möglichkeiten einer systematischen Fehlersuche bieten, da bekannt ist, in welche Richtung die Parameter verändert werden müssen, um beim nächsten Versuch besseren Erfolg zu haben. Der aktuelle Status des Projekts kann unter http://

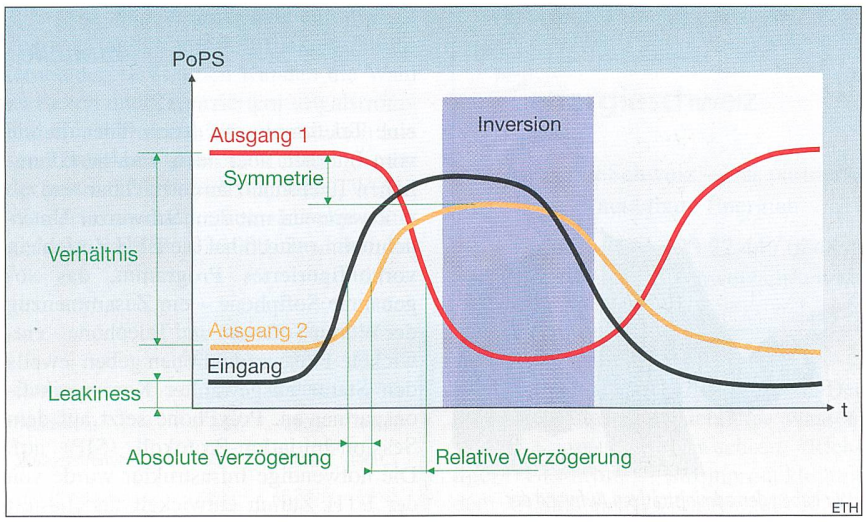


Bild 6 Signalverlauf
Die Abbildung zeigt Ein- und Ausgangssignale, über die Zeit aufgetragen. Angegeben sind verschiedene Parameter, mit denen das Verhältnis der Signale zueinander charakterisiert werden kann.

parts2.mit.edu/wiki/index.php/ETH_Zurich_2005 verfolgt werden.

Forschungsgruppe für synthetische Biologie

Neben den beiden vorgestellten Beispielen bietet das neue Feld der synthetischen Biologie noch viele weitere Designs, die mit Bio-Bricks realisiert wurden. Informationen dazu finden sich auf den Links der Bio-Brick-Datenbank[3], eine Reihe kreativer Projekte finden sich auf den Unterseiten des jährlichen iGEM Competition,[4] einem internationalen Studentenwettbewerb über synthetische Biologie. Nicht unerwähnt bleiben sollte, dass auch in der Schweiz eine Forschungsgruppe zur synthetischen Biologie gegründet wurde.[5] Wegweisend ist hier die Interdisziplinarität: Die Gruppe besteht aus Professoren der Elektrotechnik, dem Maschinenbau, der Biotechnologie und der Informatik, die gemeinsam dieses neue Gebiet erforschen.

Referenzen

[1] D. Endy: Foundations for Engineering Biology, Nature, 2005, 438, 449–453
[2] T.S. Gardner, C.R. Cantor, J.J. Collins: Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli, Nature, 2000, 403, 339–342

Angaben zu den Autoren

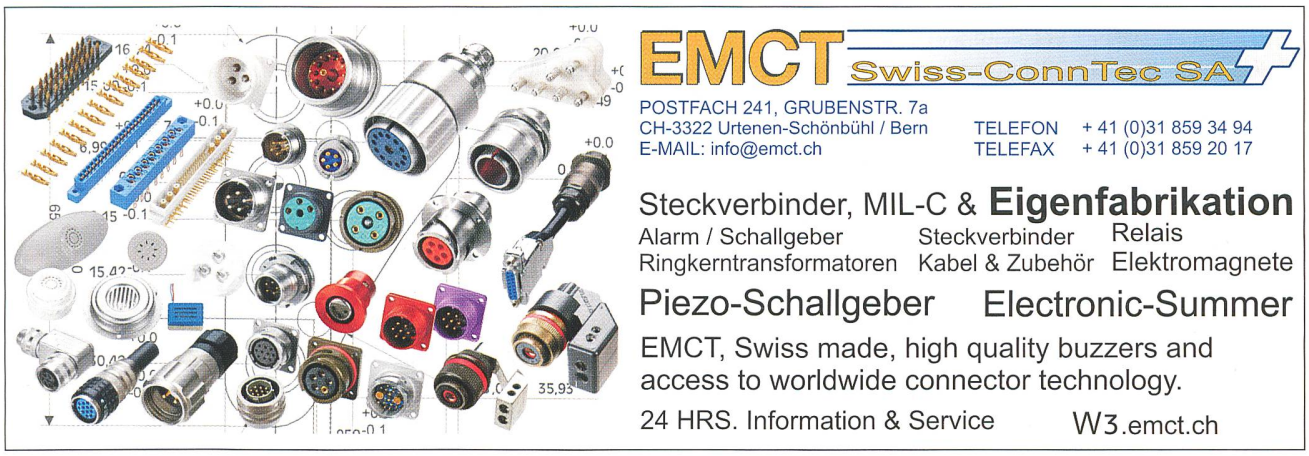
Kristian Nolde, dipl. Ing., hat an der Technischen Universität Hamburg-Harburg und der Harvard University studiert. Er promoviert seit 2003 am Institut für Automatik der ETH Zürich. Seine Interessensgebiete sind synthetische Biologie und optimale Regelung.
ETH Zürich, Institut für Automatik, 8092 Zürich, nolde@control.ee.ethz.ch

Sven Panke, Prof. Dr., leitet seit Oktober 2001 als Assistenzprofessor das Bioprozesslabor der ETH Zürich im Department für Maschinenbau und Verfahrenstechnik. Mithilfe der synthetischen Biologie versucht seine Gruppe, neue oder optimierte Verfahren mit biologischen Systemen zu entwickeln (www.ipe.ethz.ch).
ETH Zürich, Institut für Verfahrenstechnik, 8092 Zürich, panke@ipe.mavt.ethz.ch

Die Autoren danken herzlich Prof. Dr. Eckart Zitzler für seine wertvollen Kommentare bei der Erstellung des Aufsatzes.

[1] Desoxyribonukleinsäure, auf Englisch abgekürzt DNA.
[2] Ribonukleinsäure, auf Englisch abgekürzt RNA.
[3] http://parts.mit.edu.
[4] http://parts2.mit.edu/wiki/index.php/Main_Page.
[5] www.syntheticbiology.ethz.ch.

Résumé

Projet de circuit au niveau ADN

Circuits biologiques synthétiques. Le génie génétique moderne est prometteur en matière de guérison de maladies encore incurables et de sources d'énergie pratiquement inépuisables. Mais comment réaliser de tels projets? La biologie synthétique représente une approche envisageable. Elle vise à intégrer à la biotechnologie les principes qui ont assuré le succès de l'ingénierie comme la standardisation, les abstractions fonctionnelles ou la séparation de la fabrication et de la conception. En fin de compte, il devrait être possible d'intégrer à des cellules vivantes de nouvelles fonctions biotechnologiques sous forme d'éléments modulaires préfabriqués, avec une haute probabilité de réussite.