



## Aplikacyjne perspektywy biologii ery postgenomowej

Andrzej B. Legocki

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Perspectives of biology in post-genomic era

#### Summary

Biology has now reached the stage postgenomic era where a sufficient amount of genetic and molecular data on biological systems has been acquired to enter the synthetic stage. The scope of modern biology is parallel with synthetic chemistry as a part of organic chemistry. The synergistic integration of existing disciplines may recreate in artificial systems the emergent properties found in nature. By recognizing biotechnological development in lines with the principles of synthetic biology, research and applied fields in the significant areas are likely to proceed much faster and in a more organized way.

#### Key words:

synthetic biology, synthetic genom, minimal cells.

Końcowe dekady XX w. zdominowane były w naukach przyrodniczych przez podejścia redukcjonistyczne. Ich kulminacją było pojawienie się i rozwój genomiki, nowego działu biologii molekularnej zajmującego się wyjaśnianiem budowy oraz architektury genomów organizmów żywych.

Jakkolwiek w wyniku wielkich osiągnięć genomiki oraz dziedzin pochodnych (proteomika, metabolomika) odślonięto fascynujące obszary wiedzy o życiu, ciągle nie było można wyjaśnić całej złożoności przyrody ożywionej. W tym celu niezbędne są nowe, wnikliwie uogólnienia na poziomie komórkowym i organizmowym, które niesie ze sobą nurt biologii systemów ogarniającej procesy biologiczne na wszystkich poziomach ich funkcjonowania (1).

#### Adres do korespondencji

Andrzej B. Legocki,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań.

Biologia systemów stanowi zintegrowaną i wielonurtową dziedzinę zmierzającą do opisanego naturalnych systemów biologicznych poczynając od sieci komórkowych do grup organizmów. Obejmuje ona mapowanie szlaków metabolicznych, opisywanie interakcji kwasów nukleinowych z białkami, a jednym z jej pierwszoplanowych celów jest rozpoznanie ilościowych powiązań i oddziaływań występujących pomiędzy różnorodnymi układami biologicznymi. Biologia systemów dostarcza w pewnym sensie analitycznych ram, z których może wyłonić się nowa dziedzina stosowana – „biologia syntetyczna” (2).

Termin „biologia syntetyczna” związany jest z wprowadzeniem do prac badawczych nad systemami biologicznymi podejść inżynierskich. Celem nowej dziedziny – biologii syntetycznej – jest tworzenie nowych układów biologicznych niewystępujących w przyrodzie o zadanych z góry, użytecznych cechach. Zakres oraz założenia biologii syntetycznej zawierają w sobie wiele elementów chemii organicznej. Odkrywanie bowiem coraz to nowych właściwości związków chemicznych naturalnego pochodzenia można z wielkim pożytkiem wykorzystać dla celów przyświecającym nowym kierunkom biologii (3). Chemia syntetyczna, która w swoim dorobku ma wiele osiągnięć technologicznych stawiała sobie początkowo za cel jedynie potwierdzanie właściwości związków chemicznych wydedukowanych z ich cech fizykochemicznych. Jeśli dotyczyło to związków biologicznie aktywnych, szybko podejmowano próby otrzymania wersji zmodyfikowanych tych związków, które wykazywałyby te same lub rozszerzone właściwości funkcjonalne. Pojawiły się w ten sposób cząsteczki chemiczne, które, mimo że same w przyrodzie nie występują, były bardziej efektywne od swych naturalnych analogów.

Biologia osiągnęła obecnie taki etap zaawansowania, w którym dokładnie rozpoznane zostały możliwości praktycznego wykorzystania potencjału biochemicznego. Zgromadzone zostały zasoby danych metabolicznych i genetycznych, które pozwalają na podjęcie prób stworzenia nowych systemów biologicznych mających nowe, poszerzone, a jednocześnie dające się w pełni kontrolować cechy.

Centralną kwestią poznawczą biologii jest zrozumienie złożoności żywych organizmów. Wiadomo, że wszystkie organizmy żywe charakteryzuje skomplikowana architektura budowy, a także duża złożoność powiązanych ze sobą szlaków metabolicznych. Można się zastanawiać, czy złożoność organizmów i naturalnych systemów warunkuje ich funkcjonowanie, czy też jest to wynik meandrów ewolucyjnych i zmian adaptacyjnych? Jeśli bowiem rzeczywiście mielibyśmy do czynienia tylko z zaszłością wynikającą z złożonej filogenezy organizmów, to skonstruowanie prostszych układów technologicznych powinno być możliwe. Wizją biologii syntetycznej jest nie tyle naśladowanie czy nawet usprawnianie istniejących systemów naturalnych, ile tworzenie nowych i uproszczonych układów dla celów poznawczych i technologicznych (4). Przy realizowaniu takich założeń postępy biologii syntetycznej mogą w najbliższych latach odegrać decydującą rolę w rozwoju przemysłu biomedycznego, farmaceutycznego, proekologicznego przemysłu chemicznego, ochrony środowiska, a także zmniejszyć naszą zależność od wyczerpywanych zasobów surowcowych.

Najdoskonalszymi reaktorami dla wytwarzania produktów naturalnego pochodzenia są żywe komórki. W biologii syntetycznej szybko podjęto problem stworzenia prostszych, ale zarazem równie efektywnych układów komórkowych, które można wykorzystać dla celów biotechnologicznych. Pojawił się koncept „komórki minimalnej”, który z jednej strony ma służyć celom poznawczym i wyjaśnieniu prebiotycznych form życia, ale także nastawiony jest na konkretne zastosowania praktyczne (5-7).

W poszukiwaniu prostych mikroorganizmów, które pozwoliłyby określić wielkość minimalnego zestawu genów warunkujących życie zwrócono się w stronę komórki ludzkiego pasożyta *Mycoplasma genitalium*, którego genom z 517 genami ma wielkość 540 tys. par zasad oraz endosymbiotycznego symbionta bakteryjnego mszyc *Buchnera aphidicola* z 450 tys. par zasad. Ponieważ dla celów technologicznych korzystne jest posługiwanie się prostszym („zminimalizowanym”) reaktorem komórkowym, podjęto badania nad określeniem, które z genów modelowych mikroorganizmów mogą być usunięte bez obniżenia ich wartości użytkowych. Obecnie przypuszcza się, że dla utrzymania funkcji życiowej bakterii wymaganych jest 200-300 genów struktury (m.in. 25 genów syntezy DNA/RNA, 120 genów syntezy białka z białkami rybosomalnymi rRNA oraz 4 geny syntezy membran). Jednocześnie podejmowane są próby wykorzystania liposomów dla skonstruowania półsyntetycznej komórki minimalnej o właściwościach możliwie zbliżonych do naturalnych struktur komórkowych (8). Do tak skonstruowanych sztucznych modeli komórki wprowadzono naturalne komponenty takie jak układy rybosomalne i grupy enzymów, co umożliwiło przeprowadzenie w nich prostych syntez (zielonego białka fluorescencyjnego GFP oraz kilku białek metabolizmu lipidów).

Konstrukcja wydajnej, półsyntetycznej komórki stanowi wielkie wyzwanie dla badaczy, zwłaszcza, że na jej podstawie można będzie zmierzyć się z dwoma wielkimi wyzwaniami współczesności zagrażającymi naszej biosferze: zmniejszeniem zawartości dwutlenku węgla w atmosferze oraz przeciwdziałaniem naszej zależności od mineralnych zasobów energetycznych. Kompleksowych badań nad tymi wyzwaniami podjął się zespół kierowany przez J. Craig Ventera po udanej transplantacji genomu bakteryjnego w obrębie dwóch szczepów *Mycoplasma* (9).

Biologia syntetyczna stanowi bezpośrednie połączenie biologii z chemią. Ma to szczególne odniesienie do chemicznej syntezy genomów prokariotycznych. W 2003 r. przeprowadzona została pierwsza pełna synteza genomu – DNA bakteriofaga  $\phi$ X174 o długości 5386 par zasad. Na odnotowanie zasługuje opracowanie technologii syntezy chemicznej tego genomu w niezwykle krótkim czasie, tj. 14 dni (10). Przewiduje się, że około roku 2010 automatyczne syntetyzery będą produkowały łańcuchy DNA o długości miliona nukleotydów (wielkość genomu *Chlamydia*, tj.  $\frac{1}{4}$  genomu *E. coli*). Firmy biotechnologiczne oferują obecnie rutynowo syntezę łańcuchów DNA o długości 10 000 – 20 000 zasad. Przy cenie poniżej 1,5 USD za nukleotyd koszty syntezy pełnego genomu bakteryjnego nie przekroczą kosztów przebadania pojedynczego leku w fazie przedklinicznej. Poważnym natomiast ogranicze-

niem dalszego usprawniania syntezy chemicznej długich łańcuchów DNA jest konieczność korygowania błędów powstałych w trakcie automatycznej syntezy. Weryfikowanie sekwencji liczących setki tysięcy czy miliony zasad nie jest bowiem zadaniem prostym.

Procesy życiowe opierają się na niewielkiej liczbie struktur, które powstały z astronomicznej liczby teoretycznie możliwych kombinacji międzyaminokwasowych –  $10^{14}$ . Co zadecydowało, że w ewolucji pojawiły się akurat te, a nie inne struktury białkowe? Przypadek czy uprzywilejowane właściwości termodynamiczne? Nie znamy oczywiście odpowiedzi na te pytania. „Białka nigdy niepowstałe” (Never Born Proteins, NBP) reprezentują kombinacje nigdy niezaimplementowane w naszym świecie białek (11). Stąd też nie były one nigdy poddane ewolucyjnej presji selekcyjnej. Czy są wśród nich polipeptydy o użytecznych właściwościach technologicznych (np. odporne na krańcowe warunki środowiska), czy też terapeutycznych? Powstało już szereg konsorcjów badawczych, które zajmują się tworzeniem dużych bibliotek losowych kodujących polipeptydy NBP o długości 50 aminokwasów.

Odrębny rozdział zamierzeń biologii syntetycznej stanowią badania nad tworzeniem nowych syntetycznych form cząsteczek RNA o zaplanowanych właściwościach. Poprzez interakcje z innymi rodzajami RNA, łańcuchami DNA, białkami oraz efektorami niskocząsteczkowymi – cząsteczki RNA pełnią w komórce szereg ważnych funkcji regulatorowych. Modułacja ich budowy może prowadzić do osiągnięcia użytkowych celów biotechnologicznych. Tworzenie syntetycznych form obejmuje cząsteczki antysensowe, ryboregulatory, rybozomy, ryboprzełączniki oraz cząsteczki interferujących RNA i mikro RNA (12).

Ważnym działem biologii syntetycznej jest inżynieria metaboliczna. Kierunek ten jest oparty na adaptacji istniejących szlaków metabolicznych do tworzenia zamierzonych produktów w technologicznie przydatnych mikroorganizmach. Jednym z przykładów inżynierii metabolicznej jest wprowadzenie do bakteriofagów T7 genów degradujących  $\beta$ -1,6-N-acetylo-D-glukozaminę – istotnego komponentu wydzielin ekstrakomórkowych. Zmodyfikowane w ten sposób bakteriofagi potrafią skutecznie oczyszczać powierzchnie instalacji przemysłowych czy wodociągów z biofilmów bakteryjnych, w których bakterie patogenne są zasocjowane na powierzchniach wraz z ekstrakomórkowymi wydzielinami polimerowymi, białkami i lipidami (13).

Innym przykładem inżynierii metabolicznej o dużym znaczeniu praktycznym jest próba uruchomienia w komórkach drożdży *S. cerevisiae* szlaku biosyntezy kwasu artemizynowego – prekursora ważnego leku antymalarycznego – artemizyny. Malaria (zimnica) towarzysząca człowiekowi od czasu hominidów zbiera dziś większe żniwo niż kiedykolwiek dotąd. Co roku zapada na nią 500 milionów ludzi, a w samej Afryce codziennie umiera na malarię 3 tysiące dzieci. Szacuje się, że połowa ludzi, którzy kiedykolwiek zamieszkiwali Ziemię zmarła na malarię. Najbardziej złośliwy spośród pasożytniczych pierwotniaków wywołujących malarię jest zarodziec sierpowaty (*Plasmodium falciparum*). Artemizyna, która jest niezwykle skutecznym lekiem

antymalarycznym w stanie naturalnym występuje w roślinie bylicy rocznej (*Artemisia annua*) w niezwykle małych ilościach. Produkcja w drożdżach kwasu artemizynowego zachodzić ma w miejsce skwalenu w wyniku wprowadzonej modulacji szlaku mewalonowego. Zasadnicze wprowadzone zmiany to zwiększenie produkcji pirofosforanu farmezylu, obniżenie ekspresji syntetazy skwalenu i zwiększenie ekspresji genów syntazy amorfa-dienu, specyficznego dla cytochromu P<sub>450</sub> (14,15).

Oprócz mikroorganizmów dogodnymi naturalnymi bioreaktorami dla produkcji przydatnych związków są rośliny. W zakresie transformowania roślin użytkowych pewnym utrudnieniem jest wprowadzanie do ich genomów zespołów wielogenowych, a jak wiadomo, większość produktów biotechnologicznych kodują białka wytwarzane przez takie właśnie grupy genów. Wprowadzanie ich do genomu rośliny może zaburzyć regulacje podstawowych funkcji rośliny – biorcy. Są jednak już i w tej dziedzinie godne do odnotowania sukcesy, jak na przykład włączenie dziegięciu różnych transgenów do genomu *Brassica* w celu wytworzenia długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (16).

Wprowadzenie do praktyki produktów nowoczesnych biotechnologii jest wypadkową wielu czynników i zależy m.in. od obowiązujących uregulowań prawnych i akceptacji społecznej. Przykładem może być transgeniczny ryż *Golden Rice* (*Oryza sativa* G.R.) wytwarzający w endospermie beta-karoten (prowitaminę A). Ryż ten uzyskano w pracowni Ingo Potrykusa w Zurychu w 2000 r. w wyniku transformacji odmiany uprawowej ryżu z udziałem dziegięciu genów szlaku karotenowego (17,18). Od tego czasu, mimo ogromnego zapotrzebowania na jego żywieniowe właściwości w krajach trzeciego świata, nie zdołano jeszcze „złotego ryżu” wprowadzić do szerokiej produkcji.

Dynamiczny rozwój i wspaniałe perspektywy dalszego rozwoju kierunków biotechnologicznych wypełniających zamierzenia biologii syntetycznej nie mogą zwolnić badaczy od refleksji i pytań natury etycznej. Wiele kwestii, które pojawiają się po podjęciu tych badań winno doczekać się możliwie jednoznacznych odpowiedzi i wyjaśnień. Czy posługiwanie się układami półsyntetycznymi przynieść może więcej zagrożeń niż prace z układami naturalnymi? Czy posługiwanie się syntetycznymi genomami lub replikującymi łańcuchami DNA może nieść ze sobą realne zagrożenia? (J.C.Venter przez rok oczekiwał na wyrażenie zgody przez komisję etyczną na przeprowadzenie syntezy chemicznej genomu ØX174). Czy technologia syntezy genomów może być wykorzystania do odtworzenia patogenów, które zostały już wyeliminowane z naszej biosfery?

Udzielenie odpowiedzi na wszystkie pojawiające się wątpliwości nie zawsze jest już dziś możliwe. Każdorazowo jednak w codzienność, a także i w etos badacza i uczonego wpisana musi być rozważa i odpowiedzialność, które w żadnych okolicznościach nie mogą być umniejszone.

## Literatura

1. Palsson B., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 1147-1150.
2. Barrett C. L., Kim T. Y., Kim H. U., Palsson B.Ø., Lee S. Y., (2006), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 488-492.
3. Benner S. A., Sismour A. M., (2005), *Synthetic biology. Nature Rev. Genet.*, 6, 533-543.
4. Pleiss J., (2006), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 735-739.
5. Luisi P. L., (2007), *Chemistry & Biodiversity*, 4, 603-621.
6. Forster A. C., Church G. M., (2006), *Mol. Syst. Biol.*, 2, 45.
7. Luisi P. L., Ferri F., Stano P., (2005), *Naturwissenschaften*, 93, 1-13.
8. Luisi P. L., (2002), *Anatomical Record*, 268, 208-214.
9. Lartigue C., Glass J. I., Alperovich N., Pieper R., Parmar P. P., Hutchison III C. A., Smith H. O., Venter C. J., (2007), *Science*, 317, 632-638.
10. Smith H. O., Hutchison III C. A., Pfannkoch C., Venter J. C., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 15440-15445.
11. Luisi P. L., Chiarabelli C., Stano P., (2006), *Orig. Life Evol. Biosph.*, 36, 605-616.
12. Isaacs F. J., Dwyer D. J., Collins J. J., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24, 545-554.
13. Lu T. K., Collins J. J., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 11197-11202.
14. Drubin D. A., Way J. C., Silver P. A., (2007), *Genes Dev.*, 21, 242-254.
15. Martin V. J. J., Pitera D. J., Withers S. T., Newman J. D., Keasling J. D., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 796-802.
16. Wu G., Truksa M., Datla N., Vrinten P., Bauer J., Zank T., Cirpus P., Heinz E., Qiu X., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 1013-1017.
17. Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I., (2000), *Science*, 287, 303-305.
18. Paine J. A., Shipton C. A., Chaggar S., Howells R. M., Kennedy M. J., Vernon G., Wright S. Y., Hincliffe E., Adams J. L., Silverstone A. L., Drake R., (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23, 482-487.