

STANISŁAW LEDAKOWICZ

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Politechnika Łódzka, Łódź

Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej

Wprowadzenie

Zaledwie cztery lata minęły od ostatniej konferencji *Postępy Inżynierii Bioreaktorowej* [1], a postęp jaki się dokonał w biotechnologii w tym czasie prześcignął najśmielsze oczekiwania. W poprzednich artykułach [1–4] starałem się wyjaśnić różnice pomiędzy inżynierią bioprocessową i biochemiczną oraz przedstawić metody analizy procesów zachodzących w bioreaktorach z różnych punktów widzenia: z poziomu molekularnego, mikroskopowego i makroskopowego. Największy postęp dokonuje się na naszych oczach w obszarze biologii molekularnej, dzięki zastosowaniu wysokowydajnych technologii tzw. *high through-put technologies*. Ale inżynierowie nie pozostają bierni w tym rozwoju biotechnologii molekularnej. Najpierw w latach 90. XX wieku włączyli się tworząc podstawy inżynierii metabolicznej. Potem dzięki identyfikacji X-omów, zmieniło się nastawienie naukowców, pojawiła się potrzeba ogarnięcia całego układu biologicznego, a nie ogniskowania badań jedynie na poszczególnych składnikach komórki. Dzięki zastosowaniu ogólnej teorii i inżynierii systemów w biologii pojawiła się nowa dziedzina – biologia systemów zajmująca się całościowym opisem funkcji komórki, poprzez ilościowe badania oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składnikami komórki, czy bioukładu. W XXI wieku rozpoczęła się era *synthetic biology* – syntezy przez żywe komórki związków organicznych nie występujących w przyrodzie. Tak zrodziła się koncepcja inżynierii biologicznej – inżynierskie projektowanie bioprocessu, która podobnie jak inżynieria chemiczna, zajmująca się z projektowaniem określonej technologii chemicznej, przyczyni się do powstania i rozwoju nowych technologii biochemicznych.

Inżynieria metaboliczna

Bailey [5] wprowadził pojęcie inżynierii metabolicznej, jako nowej dyscypliny zajmującej się polepszaniem aktywności komórek w wyniku zmian funkcji enzymatycznych, transportowych i regulacyjnych za pomocą techniki rekombinacji DNA. Definicja inżynierii metabolicznej zaproponowana przez Stephanopoulosa i in. [6] w dosłownym tłumaczeniu, jest następująca: *inżynieria metaboliczna to ukierunkowana poprawa tworzenia produktów lub właściwości komórkowych poprzez modyfikację specyficznych reakcji biochemicznych lub wprowadzenie nowych, z wykorzystaniem technologii rekombinacji DNA*. Istotą inżynierii metabolicznej jest, jak w typowych naukach inżynierskich, połączenie analitycznego i syntetycznego podejścia do problemu, a mianowicie połączenia metod analitycznych, niezbędnych do ilościowej oceny strumieni metabolitów i ich kontroli, z technikami biologii molekularnej, umożliwiającymi przeprowadzenie modyfikacji genetycznych. Praktycznym celem inżynierii metabolicznej jest zaprojektowanie

inżynierii i wytworzenie optymalnych biokatalizatorów, dzięki którym uzyskamy największą szybkość biosyntezy i wydajności konkretnego produktu. Inżynieria metaboliczna ma za zadanie nie tylko optymalizację komórkowych procesów genetycznych i regulatorowych w celu podniesienia wydajności biosyntezy określonego produktu, ale także redukcję zużycia energii przez komórkę, (tzn. zmniejszenia kosztów energetycznych reprodukcji) oraz tworzenia odpadów (niepożądanych, ubocznych produktów). Inżynieria metaboliczna jest typową interdyscyplinarną dziedziną wykorzystującą zasady inżynierii reakcji chemicznych, informatyki, biochemii i biologii molekularnej w celu takiej modyfikacji szlaków metabolicznych, aby uzyskać maksymalny strumień wybranego metabolitu – produktu. Biochemia dostarcza nam map szlaków metabolicznych i mnóstwo informacji dotyczących mechanizmów reakcji biochemicznych, ich regulacji oraz częściowo stechiometrii i kinetyki tych reakcji, chociaż to jest już bardziej zadanie inżynierii reakcji chemicznych. Genetyka, biologia molekularna i inżynieria genetyczna dostarczają narzędzi i technik laboratoryjnych niezbędnych do kwantyfikacji strumieni metabolitów i genetycznych modyfikacji organizmów, za pomocą technologii rekombinacji DNA. I wreszcie inżynieria chemiczna, wykorzystując stosowane od lat metody podejścia do analizy procesów jednostkowych i reakcji chemicznych oraz całych systemów, umożliwia właściwą ilościową analizę złożonego, zintegrowanego układu reakcji biochemicznych o różnych szybkościach.

Wielkość strumieni metabolitów – produktów pośrednich przekształczanych z substratu do produktu, według określonej sekwencji reakcji biochemicznych to podstawowy wyznacznik, ilościowy parametr szlaków metabolicznych. Takimi zagadnieniami jak identyfikacja struktury sieci metabolicznej, kwantyfikacja strumieni metabolitów *in vivo*, i identyfikacja struktury kontroli strumieni metabolitów, zajmuje się tzw. analiza strumieni metabolicznych MFA (*Metabolic Flux Analysis*). Analiza strumieni metabolicznych nie daje jednak odpowiedzi jak zmienić wartości tych strumieni w pożądanym kierunku. Tymi zagadnieniami zajmuje się drugi ważny dział inżynierii metabolicznej – analiza regulacji, czy kontroli metabolicznej MCA (*Metabolic Control Analysis*).

Analiza strumieni metabolicznych była stosowana do wielu organizmów, ale przede wszystkim do analizy następujących drobnoustrojów: bakterii: *E. coli*, [7,8] *C. glutamicum* [9], *B. subtilis* [10] *B. megaterium* [11]; drożdży: *S. cerevisiae* [12, 13], *Pichia pastoris* [14]; grzybów: *A. niger*, *A. nidulans* [15], *Penicillium chrysogenum* [16].

Metoda izotopomerowa (znakowanie izotopami ^{13}C , lub ^{14}C w odpowiednich miejscach i odczyt za pomocą GC-MS) pozwala obliczyć nieznane strumienie metabolitów wewnątrzkomórkowych i jest coraz częściej wykorzystywana w celach bio-

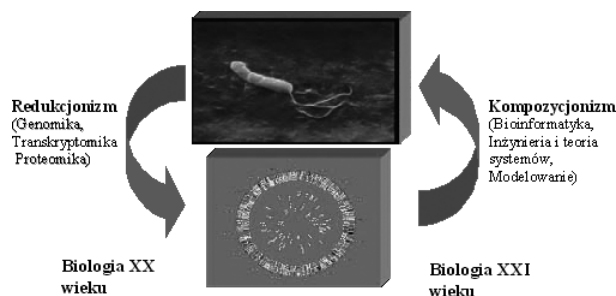
medycznych w badaniach metabolizmu kardiomiocytów [17], czy w fizjologii metabolicznej [18]. Analiza strumieni metabolicznych staje się potężnym narzędziem monitorowania funkcji tkanek [19], co ma duże znaczenie w zrozumieniu wielu stanów chorobowych. Niestety metoda ta jest ograniczona do śledzenia jednego lub zaledwie kilku strumieni w komórkach ssaczych, czy komórkach określonych organów ludzkich. Poznanie chorobowych fenotypów i metabolizmu leków to główny cel tych badań. Ta dziedzina zastosowań inżynierii metabolicznej do analizy danych klinicznych i ewaluacji terapii lekowych jest bardzo ważna i perspektywiczna.

Nowym jeszcze niezbadanym obszarem zastosowań inżynierii metabolicznej jest przepływ informacji (szlaki przekazywania sygnałów). Przyłączenie jednego ligandu uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych, wywołuje ekspresję wielu genów, a z drugiej strony ekspresja tego samego genu może być uruchamiana przez wiele ligandów. Wzajemne oddziaływanie pomiędzy szlakami metabolicznymi i szlakami przekazywania sygnałów jest bardzo skomplikowane i tylko systemowe podejście pozwoli przeanalizować ich wzajemne powiązania. Inną ważną rolę, jaką ma do spełnienia inżynieria metaboliczna to ilościowa analiza i zrozumienie sieci reakcji biochemicznych, która jest obiektem planowanych modyfikacji genetycznych, w celu poprawy fenotypu. Powiązanie inżynierii metabolicznej z genomiką funkcjonalną, przy wykorzystaniu najnowszych osiągnięć biologii molekularnej gwarantuje dalszy postęp biotechnologii molekularnej i jej zastosowań praktycznych.

Wprowadzenie do biologii systemów

Obserwując rozwój biologii molekularnej łatwo dostrzec wnikliwe rozpoznawanie tajemnic komórki, jej budowy i funkcji na coraz to głębszym poziomie. Ten burzliwy rozwój biologii XX wieku, przyspieszany osiągnięciami genetyki molekularnej, odbywał się zgodnie z koncepcją redukcjonizmu. Rozwój wysokosprawnych technik umożliwił pełną identyfikację genomu, wielu organizmów, ale nie porzeczono na tym – dąży się do poznania transkryptomu, proteomu, które są już prawie skompletowane dla drożdży *S. cerevisiae*. Metabolom jest badany metodami izotopomerycznymi, a wciąż udoskonalane modele komputerowe umożliwiają symulacje *in silico* i szybkie przewidywanie efektów mutacji, wpływów środowiska (np. szok osmotyczny, feromony, itp.), czyli – *environment*. Dzięki temu zmieniło się nastawienie naukowców – pojawiła się potrzeba ogarnięcia całego układu biologicznego, a nie ogniskowania badań jedynie na poszczególnych składnikach komórki. Powstała nowa dziedzina biologii systemów zajmująca się całościowym opisem funkcji komórki, poprzez ilościowe badania oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składnikami komórki. Nastąpiło odwrócenie kierunku poznania, przejście od redukcjonizmu do kompozycjonizmu, a obecnie obowiązujący paradygmat biologii jest zgodny z koncepcją holistyczną (Rys. 1.)

Biologia systemów dąży do poznania komórki i organizmu dzięki wspomnianym wysokosprawnym technikom, do rekonstrukcji i integracji układów komórkowych (sieci metabolicznych, regulacji transkrypcji, interakcji gen-białko, białko-białko, itd.) ich zamodelowania i symulacji. Przejście od analizy do syntezy wymusza rozwój modeli matematycznych i symulacji komputerowych oraz powiększenie bazy danych np. dotyczących regulacji i kinetyki. Zatem oprócz nauk czysto



Rys. 1. Zmiana paradygmatu biologii

przyrodniczych dużą rolę do spełnienia mają tu nauki inżynierskie: inżynieria biochemiczna, cybernetyka, inżynieria informatyczna, a w szczególności teoria i inżynieria systemów. Biologia systemów pozwala na integrację wiedzy biologicznej, zrozumienie jak molekule w komórce oddziałują na siebie w sieci powiązań – interakcje białko-białko, czy pomiędzy DNA a białkami. Aby ilościowo objąć te oddziaływania trzeba zastosować podejścia znane inżynierom z modelowania, projektowania złożonych systemów, takich jak np. sieć rurociągów w zakładzie chemicznym. Taki model pozwala w pełni zrozumieć i przewidywać zachowanie się układu, co sprowadza się w przypadku biologii do przejścia od genotypu do fenotypu.

Biolodzy najczęściej proponują modele o charakterze koncepcyjnym, jakościowym. Natomiast inżynierowie stosują metody matematyczne i jeśli jest znany mechanizm zjawiska, próbują opisać je ilościowo. Układ biologiczny nie jest zestawem genów i białek ale ujmuje wzajemne powiązania i oddziaływania między nimi, i czasami potrafi nas zaskakiwać swoim zachowaniem, które nie jest przypadkowe. Ten fenotyp ma ścisłe powiązania z genotypem poprzez liczne sprzężenia zwrotne, uwzględnia oddziaływania czynników środowiskowych na ten delikatny, wrażliwy układ, ale czasami nie jest podatny na wszelkie zmiany, jest na nie wręcz odporny i bardzo stabilny (cecha ta określana jest jako *robustness*). Najlepiej poznanymi szlakami w biologii są szlaki metaboliczne i tu wejście inżynierii zaowocowało powstaniem wspomnianej już inżynierii metabolicznej. Można je wykorzystać do ustalenia sieci oddziaływań pomiędzy proteinami. Znacznie słabiej poznane są szlaki przekazywania sygnałów. Ale trzeba pamiętać, że analiza strumieni metabolicznych i ich regulacji dotyczy stanów ustalonych, a stosowane modele są zlinearyzowane, zatem trudno byłoby je zastosować do opisu całego, niestacjonarnego z natury bioukładu. Transdukcja sygnałów nie jest liniowa, a stany ustalone nie są w tym przypadku interesującymi obiektami. Dlatego dopiero biologia systemów ujmuje w całości zachowanie się układów ożywionych, bazując na ogólnej teorii i inżynierii systemów, która powstała znacznie wcześniej dla opisu sztucznych układów dynamicznych.

Zastosowanie ogólnej teorii i inżynierii systemów w biologii znalazło już swoje odzwierciedlenie w monografiach *Palsson* [20] i *Alona* [21]. *Palsson* podzielił materiał książki na trzy części. Pierwsza dotyczy zagadnień biochemicznych – rekonstrukcji sieci biochemicznych, w tym szlaków metabolicznych, transkrypcyjnych i przekazywania sygnałów. Część druga zajmuje się zapisem matematycznym zrekonstruowanych sieci biochemicznych, a w szczególności wykorzystaniem rachunku macierzowego do zapisu stechiometrii przemian metabolicznych i topologicznymi właściwościami macierzy

stechiometrycznych. W części trzeciej monografii *Palssona* można znaleźć wiele przykładów ilustrujących jak funkcjonalne stany zrekonstruowanych sieci biochemicznych odnoszą się bezpośrednio do fenotypów komórkowych, takich organizmów jak *E.coli*, czy *Helicobacter pylori*. Punktem wyjścia są informacje biochemiczne i genetyczne zawarte w bazach danych, takich jak np. BIGG, a za pomocą metod matematycznych tworzone są modele komputerowe umożliwiające symulacje *in silico*.

W monografii *Alona* [21] można znaleźć wiele konkretnych przykładów – rozwiązań postawionych problemów rachunkowych biologii systemów. To znacznie ułatwia pełniejsze zrozumienie podstawowych zasad biologii molekularnej z punktu widzenia teorii systemów. Pierwsze rozdziały także i tu poświęcone są sieciom transkrypcji genów i transdukcji sygnałów, a kolejne – autoregulacji i pętlom sprzężenia zwrotnego (ujemne i dodatnie sprzężenie zwrotne) stabilizującym stan biosystemu w obliczu zakłóceń, różnych fluktuacji. Zagadnienia stabilności (*robustness*) układów biologicznych autor rozpatruje na konkretnych przykładach np. zjawiska chemotaksji bakterii, tzn. poruszaniu się bakterii zgodnie z gradientem stężenia specyficznych chemikaliów, w kierunku atraktantów, bądź w przeciwnym kierunku do repelentów. Autor przytacza mechanizm i opis matematyczny różnicowania się komórek, aż do tworzenia tkanek, w polu gradientu stężenia morfogenów, tj. cząsteczek sygnałowych, które są zazwyczaj białkami. W zależności od stężenia morfogenu, który przyłącza się do receptora błony komórkowej i uruchamia kaskadę sygnałową docierającą do jądra, uruchamiana jest ekspresja określonych genów. Zatem los komórki zależy od stężenia morfogenu. To oddziaływanie komórki z morfogenami i inhibitorami prowadzi do niezakłóconego różnicowania się komórek. Problemy stabilności tworzonych struktur komórkowych i korygowania błędów biosyntezy białek, a w szczególności procesu translacji, są także obiektem rozważań. Dodatkowo omówione są obwody genetyczne w bakteriach, ich optymalna, naturalna (w wyniku ewolucji) selekcja. W celu zrozumienia ewolucyjnej optymalizacji formułuje się funkcję dopasowania (*fitness function*), która powinna być maksymalizowana. Szczegółowe rozważania *Alona* dotyczą dobrze poznanego operonu laktozowego i regulacji genów. Autor zauważa zadziwiająco prostotę złożonych układów biologicznych, zarówno co do struktury jak i skali czasowej. Rozpoznawane motywy w złożonych sieciach transkrypcji genów, czy przekazywania sygnałów ułatwiają zrozumienie licznych oddziaływań między proteinami i genami oraz praw rządzących zachowaniem się układów biologicznych.

Inżynieria biologiczna – biologia syntetyczna

W latach siedemdziesiątych dwudziestego wieku genetykę molekularną po raz pierwszy zaadaptowano do produkcji wysoko wartościowych białek do celów medycznych i analitycznych oraz kultur komórek zwierzęcych. Obecnie gen stał się źródłem informacji, która może być umieszczona w komórce organizmu dobrze znanego i dostosowanego do produkcji przemysłowej, jak np. bakterii *E. coli*, *Bacillus spp.*, grzybów strzępkowych *Aspergillus spp.*, drożdży, komórkach insektów itp. Ciągłe rosnąca wiedza dotycząca genów i ich przenoszenia z jednego organizmu do drugiego umożliwiła wytwarzanie określonego produktu w wielu organizmach żywych, takich

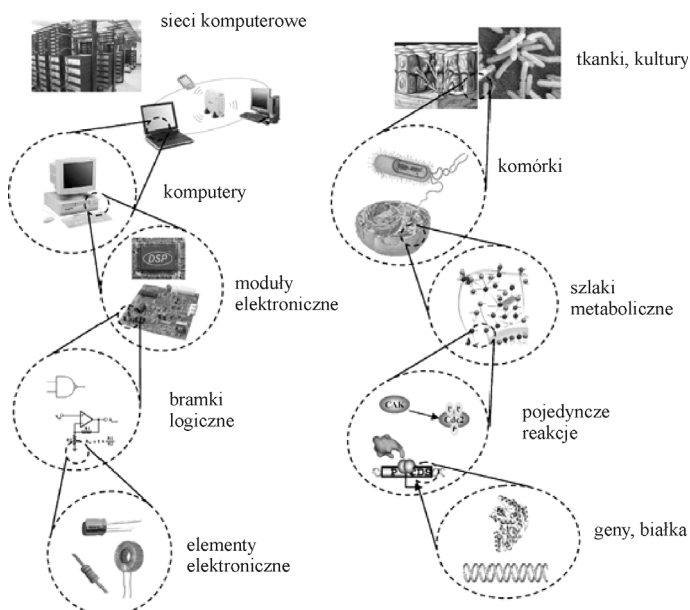
jak drobnoustroje prokariotyczne i eukariotyczne, kultury komórkowe, jaja, rośliny i zwierzęta transgeniczne [22].

We wprowadzeniu do biologii systemów zasygnalizowano jedynie występujące problemy i te, które są jeszcze do rozwiązania. Biologia systemów wymaga rozwoju modeli matematycznych, symulacji komputerowych i powiększenia bazy danych, zwłaszcza dotyczących kinetyki bioprocessów oraz ich regulacji na poziomie molekularnym. Niemniej jednak nastąpiło w biologii wyraźne przejście od analizy do syntezy, od filozofii redukcjonizmu do holizmu. Modele *in silico* dla dobrze zbadanych biosystemów są wykorzystywane w analizie, interpretacji oraz do przewidywania zależności genotyp-fenotyp. Duże nadzieje wiąże się z ich wykorzystaniem w biotechnologii w zindywidualizowanej medycynie (w oparciu o indywidualny genom człowieka).

W roku 1978, gdy przyznano nagrodę *Nobla* za odkrycie nukleaz restrykcyjnych, nasz rodak profesor *Wacław Szybalski*, komentując to wydarzenie stwierdził, że rodząca się wtedy technika rekombinacji DNA doprowadzi nas do syntezy biologicznej [23]. Jego prorocze słowa w pełni się sprawdziły i obecnie obserwujemy powstanie i rozwój nowej dyscypliny – syntezy, bądź wymiennie nazywanej *inżynierią biologiczną*, będącą integracją biologii molekularnej i nauk inżynierskich: informatycznych i komputerowych oraz teorii systemów.

Termin *synthetic biology* pojawił się w literaturze już w 1980 roku [24] w opisie genetycznie modyfikowanych bakterii za pomocą techniki rekombinacji DNA, jakkolwiek był raczej w sensie znaczeniowym synonimem bioinżynierii. W 2000 roku ponownie wprowadzono ten termin *synthetic biology* [25] podczas dorocznego spotkania *American Chemical Society* w San Francisco, USA, do opisu syntezy przez żywe komórki związków organicznych nie występujących w przyrodzie. Termin ten oznaczał bardziej usiłowania badaczy do *zaprojektowania życia* [26]. *Benner* i *Sismour* [26] dzielą biologów zajmujących się *syntezą biologiczną* na dwie grupy. Jedni mają na celu stworzenie sztucznego życia z molekuł nie występujących w naturze, drudzy poszukują wymiennych części występujących w naturze do stworzenia układów funkcjonujących według zaprojektowanego schematu.

Cele *syntezy biologicznej* są bardzo ambitne, porównywane do projektu lądowania człowieka na księżycu w latach 60. XX wieku. Samo sformułowanie celów wskazuje jedynie na dalsze kierunki badań i toruje rozwój tej nowej dyscypliny. *Inżynieria (synteza) biologiczna* wykorzystuje znajomość składników komórki i ich wzajemnych powiązań do zaprojektowania komórki i jej składników o nowych poprawionych właściwościach i możliwościach. Można powiedzieć, że synteza biologiczna jest rozszerzeniem syntezy chemicznej – zaprogramowanie takiej sekwencji DNA, która umożliwi wytworzenie określonego produktu (np. leku) lub układu np. oscylatora biologicznego [27]. Współpraca biologów, chemików i inżynierów umożliwia zaprojektowanie określonego układu biologicznego, zsyntetyzowanie odpowiednich fragmentów DNA, (sztuczna, ale żywa komórka), która będzie produkowała potrzebny bioprodukt. Ale aby udała się konstrukcja niezawodnej maszyny powielającej, wymagana jest pewna standaryzacja i umiejętne powiększenie skali bioprocessu. Bardzo obrazowo *Adrianantoandro* i in. [28] porównali cele i metody *biologii syntetycznej (inżynierii biologicznej)* z hierarchią, jaka panuje w inżynierii komputerowej (Rys. 2). Trudności rozwojowe *inżynierii biologicznej* [27] to: złożoność, skomplikowana, niepewna konstrukcja i charakterystyka oraz spontaniczna



Rys. 2. Analogia pomiędzy inżynierią biologiczną a komputerową (na podstawie Adrianantoandro i in. [28])

zmienność układów biologicznych i jeszcze dodatkowo ewolucja. Potrzebna jest standaryzacja w biologii – stosowanie wymiennych elementów, modułów w syntezie biologicznej (białek, genów). Istniejące standardy w biologii, np. mikromacierze, klasyfikacja enzymów, baza danych krystalograficznych są niewystarczające, aby zapewnić typowo inżynierskie projektowanie bioproduktu, tak jak to się dzieje z projektowaniem określonej technologii chemicznej, na którą obok reakcji chemicznych składają się operacje jednostkowe.

Bez wątpienia potrzebne są także zmiany w systemie edukacji biologii i biotechnologii. Na uniwersytetach w USA i w Europie Zachodniej pojawiają się nowe instytuty inżynierii biologicznej, powstało także towarzystwo *Society for Biological Engineering*, przy Amerykańskim Stowarzyszeniu Inżynierów Chemików AIChE (www.aiche.org/icbn).

Zatem otwiera się świetlana przyszłość przed inżynierią biologiczną; możemy być wkrótce świadkami burzliwego roz-

woju tej nowej dyscypliny. Uważa się, że umożliwi ona rozwiązanie szeregu problemów ludzkości: żywnościowych, energetycznych i zdrowotnych.

LITERATURA

1. S. Ledakowicz: Inż. Ap. Chem., **44**, nr 4s, 4 (2005).
2. S. Ledakowicz: Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, 26 nr 822, (1999).
3. S. Ledakowicz: Inż. Chem. i Proces., **22**, (3A) 65 (2001).
4. S. Ledakowicz: Inż. Ap. Chem., **41**, nr 3s, 4 (2002).
5. J.E. Bailey: Science, **252**, 1668, (1991).
6. G.N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, J. Nielsen: Metabolic Engineering: Principles and Methodologies, San Diego, Academic Press. (1998).
7. E. Fischer, U. Sauer: European J. Biochem., **270**, nr 5, 880 (2003).
8. J. Zhao, K. Shimizu: J. Biotechnology, **101**, nr 2, 101 (2003).
9. C. Wittmann, P. Kiefer, O. Zelder: Appl. Environ. Microbiol., **70** nr 12, 7277 (2004).
10. E. Fischer, U. Sauer: Nature Genetics, **37**, nr 6, 636 (2005).
11. T. Fürch, R. Hollmann, C. Wittmann, W. Wang, W., W.D. Deckwer: Bioproc. Biosystem Eng., **30**, nr 1, 47, (2007).
12. O. Frick, C. Wittmann: Microbial Cell Factories, **4**, 30 (2005).
13. L.M. Blank, U. Sauer: Microbiology, **150**, nr 4, 1085 (2004).
14. A. Sola, H. Maaheimo, K. Ylonen, P. Ferrer, T. Szyperski: Eur. J. Biochem. **271**, nr 12, 2462, (2004).
15. H. David, A. Krogh, C. Roca, M. Akesson, J. Nielsen: Microbiology, **151**, 2209 (2005).
16. J. Thykaer, B. Christensen, J. Nielsen: Metabolic Engineering, **4** nr 2, 151 (2002).
17. C. Des Rosiers, S. Lloyd, B. Comte, J. Chatham: Metabolic Engineering **6** nr 1, 44 (2004).
18. J.K. Kelleher: Metabolic Engineering, **3** nr 2, 100, (2001).
19. K. Lee, F. Berthlaume, G.N. Stephanopoulos, M. Yarmush: Tissue Eng., **5** nr 4, 347, (1999).
20. B.O. Palsson: Systems biology, Properties of reconstructed networks. Cambridge University Press, New York, USA, (2006).
21. U. Alon: An introduction to systems biology, Design principles of biological circuits, Chapman & Hall/ CRC, Boca Raton, USA, (2007).
22. U. von Stockar, L.A.M. van der Wielen: Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., **80**, 125. (2003).
23. W. Szybalski, A. Skalka: Gene, **4**, 181 (1978).
24. B. Hobon: Medizin, Klinik, **75**, 14 (1980).
25. R. Rawls: Chem. Eng. News, **24** April, 49 (2000).
26. S.A. Benner, A.M. Sismour: Nature reviews, genetics, **6**, 533 (2005).
27. D. Endy: Nature, **438**/24 Nov., 449 (2005).
28. E. Adrianantoandro, S. Basu, D. Karig, R. Weiss: Molecular Systems Biology, **1**, (2006).