

Biologia syntetyczna

Od syntezy oligonukleotydów do *Mycoplasma laboratorium*

Michał Laskowski*

1. Czym jest biologia syntetyczna? [1,2]

Po wykazaniu, poprzez otrzymanie mocznika z amoniaku i cyjanowodoru przez Friedricha Wöhlera w 1828 r., że nie istnieje żadna tajemnicza siła witalna, naukowcy starają się odtworzyć i ulepszyć możliwości organizmów biologicznych czego ukoronowaniem jest powstanie biologii syntetycznej. Jest to dyscyplina naukowa stanowiąca połączenie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Jej celem jest racjonalne projektowanie

i tworzenie sztucznych systemów biologicznych w oparciu o naturalne pierwowzory. Zapowiedź jej powstania ogłosił w 1974 roku (na długo przed zsekwencjonowaniem pierwszych genomów!) wybitny polski naukowiec Waław Szybalski:

Aż do teraz pracowaliśmy nad opisową fazą biologii molekularnej. (...) Jednakże prawdziwym wyzwaniem jest wkroczenie do fazy badań obejmujących biologię syntetyczną. Będziemy wymyślać nowe ele-

menty kontrolne i wprowadzać je do genomów lub tworzyć od podstaw nowe genomy.

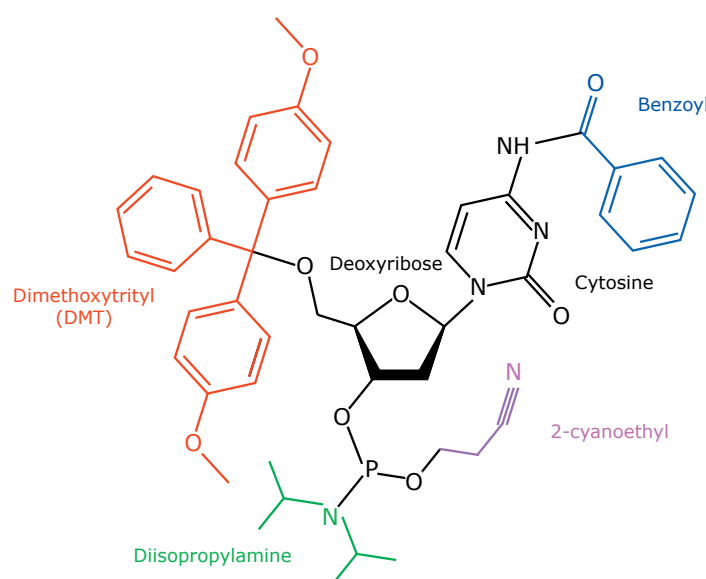
Jednym z podstawowych problemów - stojąc na drodze do stworzenia nowych genomów - jest technologia ich precyzyjnego oraz możliwie jak najtańszego tworzenia na drodze chemicznej lub biotechnologicznej. Procesy syntezy chemicznej dużych fragmentów DNA, zawierających sztuczne lub naturalne sekwencje to jedno z najważniejszych elementów biologii syntetycznej. Synteza chemiczna to technologia dynamicznie rozwijająca się. Jej jedyną domeną przestały być prestiżowe ośrodki akademickie ale pojawiły się również firmy specjalizujące się w dostarczaniu zamówionych sekwencji co dodatkowo przyspiesza badania naukowe.

2. Mechanizm i procedury synteza oligonukleotydów [3]

Synteza oligonukleotydów stanowi pierwszy krok ku tworzeniu pełnych sekwencji dla sztucznych genomów. Jest to proces otrzymywania metodami chemicznymi krótkich fragmentów DNA lub RNA o ściśle zdefiniowanej sekwencji zasad nukleotydowych. Synte-

za chemiczna opracowana została w latach 70. i w dalszym ciągu jest udoskonalana. Przekłada się to na ciągły spadek cen dostępnych komercyjnie usług w tym zakresie. Dawnemu przekroczone została psychologiczna bariera 1 dolara za 1 parę zasad.

Rodzaje syntezy oligonukleotydów możemy podzielić ze względu na fazę w jakiej odbywają się reakcje: w roztworze lub na podłożu stałym. Synteza na podłożu stałym jest dziś powszechnie wykorzystywana ze względu na łatwość w oczyszczaniu produktów poszczególnych etapów procedury oraz możliwość automatyzacji. Ilość odmian syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym jest duża. W zależności od wybranego związku wejściowego istnieje: metoda fosforanodiestrowa, fosforanotriestrowa oraz fosforano(III)triestrowa. Ze względu na wielkość łączonych jednostek można wyróżnić synteze z monomerów oraz synteze blokową. Do reakcji wykorzystuje się zazwyczaj jednostki nukleotydowe posiadające w pozycji 3'-O aktywowaną grupę fosforanową, do której przyłączane są kolejno następne jednostki posiadające wolną grupę 5'-OH.



Rys.1. Amidofosforyn deoksycytydyny z grupami ochronnymi. Źródło: <http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Phosphoramidite.png&filetimestamp=20090120085507>



Pozostałe centra reaktywne nie biorące udziału w danej reakcji są zablokowane grupami ochronnymi usuwanymi po zakończeniu syntezy oligonukleotydów.

Przykładowa procedura syntezy na nośniku stałym

START: Podłoże stałe posiada pierwszy nukleozyd, przyłączony końcem 3'.

1. Przemycie roztworem kwasu w celu usunięcia grupy DMTr z pozycji 5'-O.
2. Przemycie roztworem aktywowanego 3'-amidofosforanu(III) odpowiedniego nukleozydu. Nukleotyd zostaje przyłączony wiązaniem fosforanowym.
3. Przemycie roztworem jodu i wody w rozpuszczalniku organicznym w obecności katalizatora nukleofilowego. Fosforan (III) utlenia się do fosforanu (V).
4. Capping - przemywanie roztworem bezwodnika octowego w celu zablokowania wolnych grup 5'-OH,
5. Powrót do punktu 1. Procedurę powtarza się aż do uzyskania pożądanego oligonukleotydu.

Przykładowa procedura oczyszczania produktu

1. Końcowe odblokowanie - poprzez umieszczenie podłoża stałego z oligonukleotydem w roztworze amoniaku uzyskuje się:
 - a) odcięcie oligonukleotydu
 - b) odblokowanie grup ochronnych z zasad heterocyklicznych;
 - c) odblokowanie reszty fosforanowej (β -eliminacja reszty cyanoetylowej).
2. Oczyszczanie produktu za

pomocą HPLC (chromatografii jonowymiennej lub w warunkach faz odwróconych) lub elektroforezy (PAGE).

Synteza chemiczna pozwala także na łatwe wprowadzanie różnorodnych modyfikacji we wszystkich elementach syntezy oligonukleotydu.

3. Standard Biobrick [4]

Standardowe części biologiczne są to formaty opisujące sekwencje DNA stawiające na standaryzację i uniwersalność. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych standardów jest Biobrick (z ang. dosłownie Bio-cegła). Fragment DNA o określonej funkcji jest oflanowany po obu stronach przez ściśle określone sekwencje nie związane w żaden sposób z istotną biologicznie sekwencją. Te graniczne fragmenty zawierają miejsca cięcia dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych. Pierwotnie było dla końców 5' EcoRI, NotI oraz XbaI a dla końców 3' SpeI, NotI oraz PstI. Zastosowanie standardu Biobrick pozwala na łączenie w łatwy sposób kilku krótszych sekwencji w spójną całość.

Aby zachęcić naukowców do korzystania z tego formatu sekwencji DNA został ogłoszony przez MIT konkurs studencki International Genetically Engineered Machine (iGEM). Zadaniem postawionym przez regulamin konkursu jest wymyślenie i zrealizowanie projektu naukowego związanego z biologią syntetyczną. Każda ze startujących drużyn otrzymuje zestaw sekwencji DNA pochodzący z Registry of Standard Biological Parts (rejestr

DNA w formie Biobrick dla kilku tysięcy sekwencji), który stanowi podstawę do realizacji opracowanego projektu. W 2009 roku wziął w nim również zespół z Polski.

4. Synteza genów wirusa [5]

Bakteriofag *Phi X174* był pierwszym wirusem, którego genom został zsekwencjonowany, poza tym jest on cząsteczką (lub organizmem w zależności od przyjętej definicji) modelowym. Dlatego też odtworzenie jego genomu za pomocą metod inżynierii biologicznej stało się kwestią czasu. W 2003 r. w ciągu zaledwie dwóch tygodni zsyntetyzowano DNA wirusa składające się z 5386 par zasad. Nie był to pierwszy przypadek pełnego odtworzenia genów wirusa metodami syntezy chemicznej lecz był on nieomal pokazem sprawności inżynierskiej zespołu prowadzonego przez Craiga Ventera (większość spektakularnych osiągnięć w dziedzinie sztucznego życia należy do prowadzonego przez tego kontrowersyjnego instytutu). Wszystkie etapy prac bowiem wykonano w ciągu dwóch tygodni - dla porównania - dokonana rok wcześniej synteza wirusa Polio była projektem trwającym dwa lata i mającym niepomiernie większy budżet. Jako podstawę do syntezy przyjęto sekwencje zamówione w firmie Integrated DNA Technologies co pozwoliło na znaczne tempo prac.

5. Sztuczne życie [6,7,8]

W jednym z eksperymentów w Craig Venter Institute zsyntetyzowano DNA z *Mycopla-*

sma mycoides i wszczepiono do komórki *Mycoplasma capricolum* - organizm dostał przydomek Synthia. Na uwagę zasługuje zwłaszcza dokładność wykonanego eksperymentu. Jeden błąd w sekwencji mógł spowodować brak lub niewłaściwą ekspresję białka kluczowego dla życia (w istocie pojedyncza delekcja w sekwencji spowodowała niemal 4 miesięczne opóźnienia). Jeśli chodzi o możliwości biologii molekularnej jest to wynik znakomity wciąż jednak jest jedynie bladym odbiciem naturalnych możliwości organizmów.

Mycoplasma laboratorium to pierwszy w świecie, zaprojektowany przez Craig Venter Institute, organizm sztuczny. Jego genom to tak zwany „zestaw minimalny” pochodzący z genów *Mycoplasma genitalium*. Dobór pierwowzoru nie był przypadkowy - *Mycoplasma genitalium* posiada jeden z najmniejszych znanych genomów. Proces jego przystosowywania polegał na usuwaniu kolejnych genów aż do pozostawienia jedynie tych niezbędnych do przeżycia. Tak opracowany i syntetycznie wytworzony genom składający się z 580 kbp opatentowany został jako *Mycoplasma laboratorium*. Aby uzyskać w pełni funkcjonalną bakterię wciąż jeszcze niezbędny jest donator - żywa komórka pochodząca od blisko spokrewnionego gatunku. Genom *Mycoplasma laboratorium* pracownicy Craig Venter Institute planują wszczepić do bakterii *Mycoplasma genitalium* zakładając (co potwierdzają eksperymencie z Synthią), że po kilku



podziałach w żaden sposób nie będzie można wykryć, że bakteria nie powstała w sposób naturalny.

W DNA *Mycoplasma laboratorium* zawarte zostały ukryte w ramach potwierdzenia sztucznej genetyki sekwencji na wysokości 246, 1081, 1109 i 1222 pz słowa dotyczące autorów: VENTERINSTITVT (od Craig Venter Institute), CRAIGVENTE (od Craig Center), HAMSMITH (od Smith Hamilton), CINDIANDCLYDE (od Cynthia Pfannkoch), GLASSANDCLYDE (od Clyde A. Hutchison oraz B.Gibson), dodatkowo cytaty słynnych naukowców i pisarza:

Robert Oppenheimer: *See things not as they are, but as they might be;*

Richard Feynman: *What I cannot build, I cannot understand;*

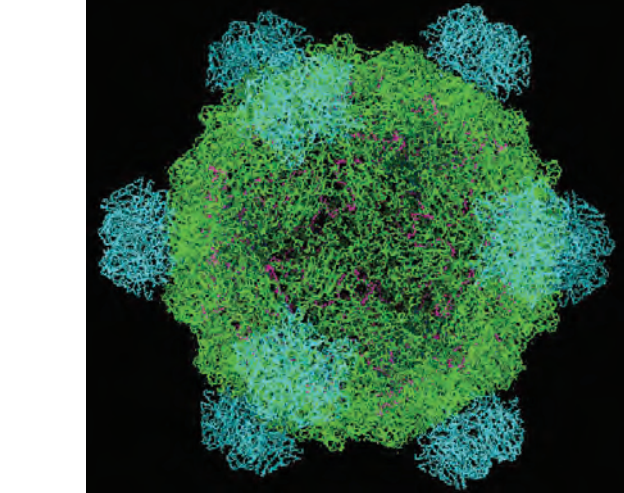
James Joyce: *To live to err, to fall, to triumph, to recreate life out of life.*

6. Etyczne problemy biologii syntetycznej

Podobnie jak GMO, biologia syntetyczna, a w szczególności możliwość wszczepiania do organizmów sekwencji nie występujących w przyrodzie, budzi kontrowersje zarówno wśród bioetyków jak i samych naukowców. Do najważniejszych zagrożeń wynikających z zastosowania syntezy sztucznych genów należą:

Zmiana właściwości immunologicznych bakterii [9]

W eksperymencie dokonanym przez Pomerantseva Staritsina, Mockova i Marianina gen cereolysin AB pochodzący z *Bacillus cereus* został wprowadzony do szczepów *Bacillus*



Rys. 2. Struktura kapsydu bakteriofaga Phi X 174. Źródło: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PhiX174.jpg>

anthracis za pomocą plazmidu pE194. Gen został następnie zintegrowany z genomem wąglika. Zarażone zmodyfikowanym szczepem chomiki nie wykazywały odporności, mimo wcześniejszego zastrzeżenia ich. Stanowi to przykład możliwości uzyskania szczepów, na które dana populacja, mimo stosowania szczepień, nie jest odporna. Na podobnej zasadzie mogło by dojść do uzyskania odpornych szczepów bakterii, do których wprowadzono by geny kodujące białka powierzchniowe zupełnie nie rozpoznawane przez układ odpornościowy. Jako inny przykład zagrożeń wynikających z wprowadzania syntetycznych genów jest możliwość nabycia patogenności przez dotychczas nieszkodliwy drobnoustrój. Dlatego też proponowanym rozwiązaniem jest wymóg produkowania organizmów syntetycznych jako mutantów aukostroficznych - organizmów niezdolnych do produkowania jednego z istotnych dla przeżycia metabolitów (np.

aminokwasu) i wymagających jego podawania w pożywkę. Z jednej strony pozwoliło by to na zmniejszenie ryzyka wydostania się takich organizmów z laboratoriów. Z drugiej strony jednak zwiększa to ich koszt hodowli i ogranicza zastosowania (np. jako czynnik rozkładający ropę naftową w miejscu wycieku).

Synteza wirusów [10, 11]

W roku 2002 w czasopiśmie „Science” pojawił się artykuł donoszący o czysto chemicznej syntezie wirusa Polio. Zespół badawczy z State University of New York wykorzystał jako podstawę sekwencję genomu dostępną w sieci. Sam wirus nie jest przydany jako broń, jednak pokazuje możliwość uzyskania wirusów bez dostępu do biologicznego materiału. Na razie procedura ta jest bardzo skomplikowana i możliwa do zastosowania jedynie przez kilku specjalistów, jednak z czasem może stać się rutynową i zautomatyzowaną procedurą (podobnie jak obecnie synteza polipep-

tydów). Jako najbardziej niebezpieczny przykład, gdzie podobna procedura mogła by być wykorzystywana jest „ożywienie” wirusa Ospy. Ostatni przypadek ospy prawdziwej miał miejsce w 1978 roku, a choroba ta została uznana za eradykowaną w roku 1980. Wszystkie znane próbki ospy prawdziwej zostały zniszczone, oprócz pilnie strzeżonych próbek w Instytucie Preparatów Wirusowych w Moskwie oraz Centrum Kontroli Chorób w Atlancie. W związku z tym szczepienia przeciw Ospie zostały wstrzymane, a większość populacji ludzkiej nie posiada odporności. Jednakże genom wirusa Ospy jest dostępny na stronie Poxvirus Bioinformatics Resource Center i może posłużyć do analogicznego odtworzenia wirusa jak w przypadku Polio. Dlatego też kwestia prewencyjnego stworzenia szczepionek jest poruszana przez epidemiologów. Jako środki zabezpieczające przed posłużeniem się biologią syntetyczną do tworzenia broni biologicznej Tom Knight z Harvard Medical School sugeruje rządowe i międzynarodowe programy nadzorowania i licencjonowania badań. W jego skład miała by wchodzić między innymi: kontrola sprzedaży automatów do syntezy DNA, badanie sekwencji zamawianych przez naukowców w poszukiwaniu potencjalnie niebezpiecznych genów oraz system licencji i uprawnień do prowadzenia badań w tej dziedzinie. Wprowadzenie podobnego rozwiązania spowodowało by z jednej strony zmniejszenie ryzyka użycia biologii synte-



tycznej w niewłaściwy sposób lecz z drugiej strony z pewnością spowolniło rozwój nauki.

Literatura

- [1] Wohler, F. (1828) Ann. Phys. Chem. 88, 253–256.
- [2] Waclaw Szybalski, *In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription*, Page 405. In: A. Kohn and A. Shatkey (Eds.), *Control of Gene Expression*, pp. 23-24, and Discussion pp. 404-405 (Szybalski's concept of Synthetic Biology), 411-412, 415-417. New York: Plenum Press, 1974
- [3] Gait M. (red.), *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford:Oxford University Press, 1984.
- [4] Knight. T. *Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks*. MIT Synthetic Biology Working Group,
- [5] Smith, Hamilton O.; Clyde A. Hutchison, Cynthia Pfannkoch, J. Craig Venter (2003). *Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (26): 15440–15445.
- [6] Gibson, B; Clyde A. Hutchison, Cynthia Pfannkoch, J. Craig Venter, et al. (2008-01-24). „Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome”. Science 319 (5867): 1215
- [7] Fraser CM, Gocayne JD, White O, et al. (October 1995). „The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*”. Science 270 (5235): 397–403.
- [8] „Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium”. Science. 2010-05-21.
- [9] Pomerantsev, A.P., Staritsin, N.A., Mockov, Y.V. & Marinin, L.I. (1997) *Expression of cereolysin ab genes in Bacillus anthracis vaccine strain ensures protection against experimental hemolytic anthrax infection*. Vaccine, 15, 1846–1850
- [10] Cello, J., Paul, A.V. & Wimmer, E. (2002) *Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template*. Science, 297, 1016–1018
- [11] The Genetic Engineering of Smallpox. WHO's Retreat from the Eradication of Smallpox Virus and Why it Should be Stopped A BRIEFING PAPER BY THE SUNSHINE PROJECT. 2002.

Strony internetowe

- [1] Blog Ken Shirriffa „Using Arc to decode Venter's secret DNA watermark,” (dostęp 2011-02-10).
- [2] Strona polskiego zespołu w iGEM. <http://2009.igem.org/Team:Warsaw> (dostęp 2011-02-10).
- [3] Informacje dotyczące niebezpieczeństw biologii syntetycznej (ang.) http://arep.med.harvard.edu/SBP/Church_Biohazard04c.htm
- [4] Poxvirus Bioinformatics Resource <http://www.poxvirus.org/index.asp?bhcp=1>

*Student V roku Biotechnologii na Politechnice Gdańskiej, dyplomant Katedry Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej

METTLER TOLEDO

W naszej ofercie:

- mikrowagi
- wagi analityczne, precyzyjne i przemysłowe
- komparatory
- wagosuszarki
- ph-/jonometry i elektrody
- pipety automatyczne
- aparaty do miareczkowania
- systemy analizy termicznej
- gęstościomierze, refraktometry, wiskozymetry
- automatyczne reaktory laboratoryjne
- systemy pomiarowe ph-/Redox, O₂, przewodności, zmętnienia



Mettler-Toledo Sp. z o.o., 02-822 Warszawa, ul. Poleczki 21
tel. (22) 545 06 80; fax (22) 545 06 88
e-mail: Polska@mt.com, www.mt.com



Zadzwoń, dowiesz się więcej: 601 77 50 47