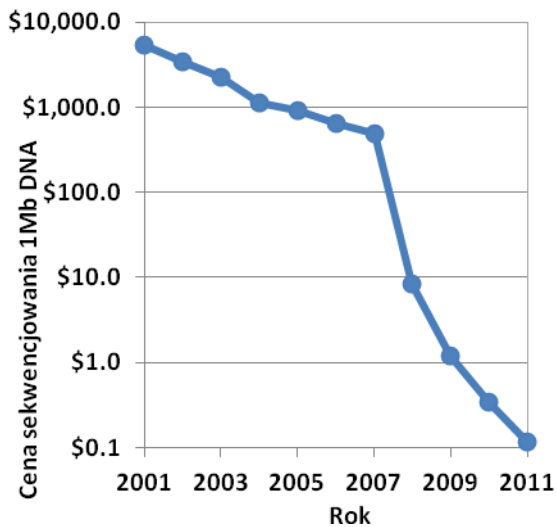


Biologia syntetyczna: inżynieria genetyczna XXI stulecia

dr n. med. Dmitry Nevozhay

The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, USA

Biologia syntetyczna jest nową dziedziną, która rozwinęła się z inżynierii genetycznej dzięki postępom w biologii molekularnej, genetyce, chemii, biotechnologii oraz innych spokrewnionych dyscyplin. Celem i przedmiotem badań biologii syntetycznej jest budowanie żywych systemów czy nawet stworzenie sztucznych organizmów do pełnienia funkcji korzystnych dla człowieka oraz poszukiwanie metod efektywnego projektowania, budowania i kontrolowania tych systemów na potrzeby nauki, medycyny oraz przemysłu.



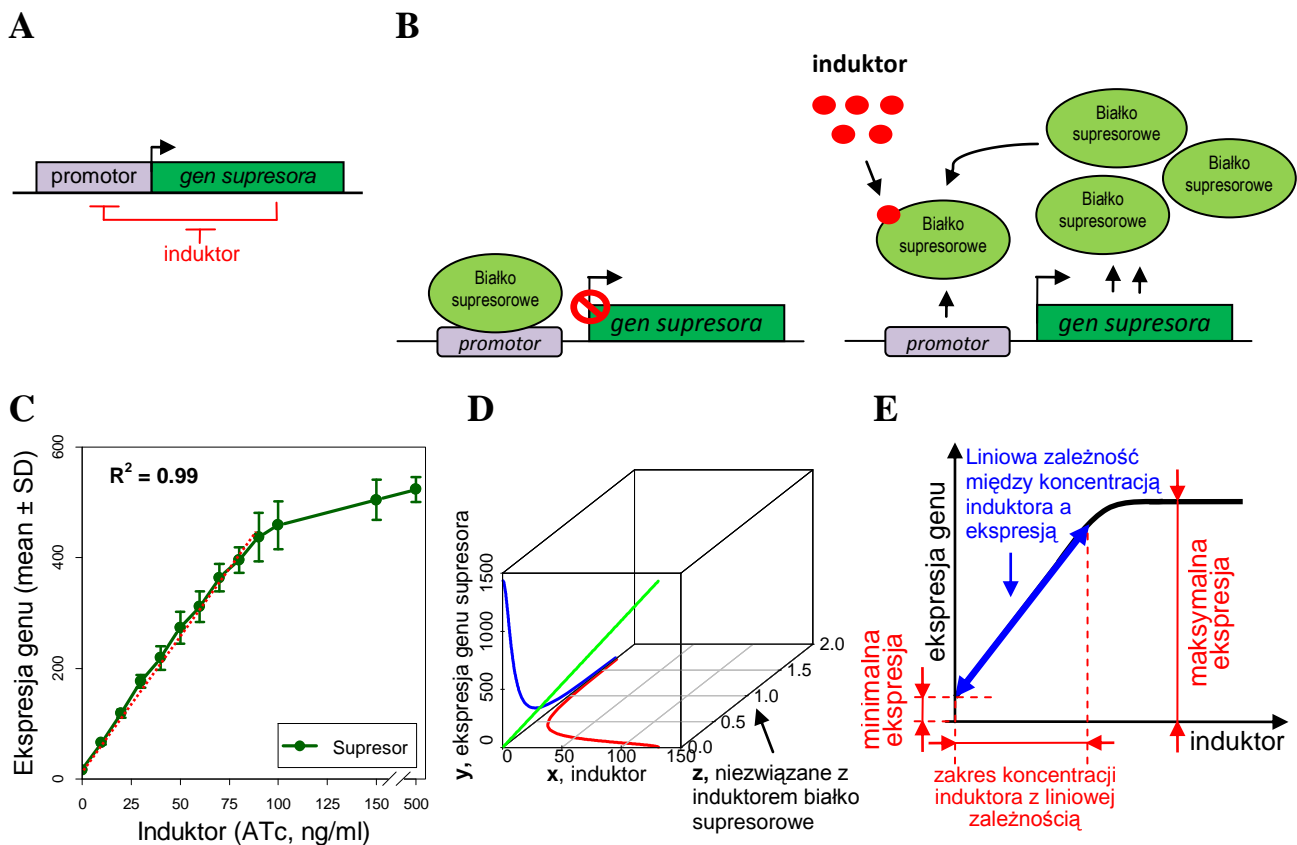
Ryc. 1. Koszty sekwencjonowania DNA w ciągu ostatnich 10 lat (dane pochodzące z National Human Genome Research Institute).

Biologia syntetyczna różni się od klasycznej inżynierii genetycznej przede wszystkim zwiększoną skalą stworzenia i modyfikacji systemów biologicznych oraz powszechnym zastosowaniem zasad inżynierii, takich jak: modularność, standaryzacja i abstrakcja. Dodatkową dostrzegalną różnicą jest szerokie zastosowanie metod obliczeniowych oraz komputerowego modelowania w projektowaniu i testowaniu systemów zanim stworzone zostaną one w laboratorium biologicznym.

Początki tej dyscypliny datowane są na przełom XX i XXI wieku wraz z rozwojem i znacznym spadkiem cen technologii niezbędnych do postępu tej dziedziny, tj. sekwencjonowanie oraz synteza DNA (Ryc. 1). Znaczącą rolę odegrało też duże zainteresowanie i napływ fizyków, inżynierów oraz informatyków do nauk biologicznych, którzy rozpowszechnili szerokie zastosowanie metod obliczeniowych i komputerowego modelowania w tej dziedzinie. Dalszy rozwój dyscypliny w dużej mierze był też stymulowany poprzez potencjalne jej zastosowanie do rozwiązania ważnych współczesnych problemów ludzkości. Typowymi przykładami takiego zastosowania są: optymalizacja produkowania biopaliwa, synteza nowych oraz tańszych leków, opracowanie innowacyjnych metod terapii genowej, projektowanie biokomputerów, inżynieria tkankowa czy nawet próby stworzenia nowych organizmów z korzystną funkcjonalnością, na przykład syntetycznych bakterii walczących z komórkami raka.

Przedmiotem naszych badań w dziedzinie biologii syntetycznej jest stworzenie nowych systemów do precyzyjnego kontrolowania ekspresji genów dla potrzeb terapii genowej oraz podstawowych badań biologicznych. W terapii genowej taki system mógłby być wykorzystywany do dawkowania ekspresji genu terapeutycznego w zależności od stanu zdrowia pacjenta oraz rozwoju choroby, podobnie do zmian dawki konwencjonalnych leków. Dla przykładu, pacjent z mutacją w genie odpowiedzialnym za syntezę niezbędnego enzymu mógłby dostać terapeutyczne DNA z genem kodującym poprawną wersję białka oraz możliwością regulacji jego ekspresji poprzez dobrze scharakteryzowany i mało toksyczny lek, podawany doustnie. Taka możliwość byłaby szczególnie przydatna dla genów z małym oknem terapeutycznym, podczas gdy zbyt niska ekspresja nie poprawia stanu pacjenta, natomiast za wysoka może mieć skutki uboczne.

W badaniach biologicznych taka kontrola pomogłaby lepiej badać funkcję genów, które mają zróżnicowane oddziaływanie w zależności od poziomu ekspresji, np.: geny uczestniczące w funkcjonowaniu układu odpornościowego i nerwowego oraz w embriogenezie. Na dodatek takie systemy do precyzyjnego kontrolowania ekspresji genów przydałyby się jako komponenty do budowania bardziej złożonych układów biologicznych.



Ryc. 2. Schemat (A) oraz mechanizm działania (B) genowego układu regulatorowego na podstawie ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym aktywność supresora jest zależna od induktora. Przy braku induktora białko supresorowe wiąże się z promotorem własnego genu i w taki sposób blokuje jego dalszą ekspresję. Natomiast po dodaniu induktora, który wiąże się z białkiem, zmieniając jego konformację, dochodzi do uwolnienia białka od promotora, co umożliwia dodatkową ekspresję genu, produkując kolejną ilość supresora, dopóki znów nie nastąpi równowaga między supresorem oraz induktorem; (C) W genetycznie modyfikowanych komórkach drożdży z integrowanym do genomu układem na podstawie ujemnego sprzężenia zwrotnego ilość ekspresji genu supresora (mierzona z użyciem cytometrii przepływowej) jest liniowo proporcjonalna do ilości induktora (w zakresie 80-90% maksymalnej ekspresji promotora, zaznaczone czerwoną linią); (D) Wspólne zależności między koncentracją induktora (x), ilości niezwiązanego z induktorem białka supresorowego (z) oraz poziomem ekspresji genu supresora (y); (E) Ogólne przedstawienie parametrów ekspresji regulowanego genu w systemie na podstawie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Współczesne systemy do ekspresji genów w komórkach ssaczy, w tym człowieka, często nie mają żadnej kontroli, polegając na promotorach dających stały poziom aktywacji. Nawet w systemach, w których istnieją możliwości kontrolowania (TetOn/Off, T-REx), mają one charakter raczej ograniczony, często pozwalając tylko na włączenie/wyłączenie genu, bez możliwości dowolnej regulacji poziomu ekspresji. Na dodatek, mają one też inne wady, m.in. duże zróżnicowanie poziomu ekspresji w populacji zmodyfikowanych komórek oraz zależność od pewnych elementów aktywujących pochodzenia wirusowego, które same w sobie mogą mieć znaczną toksyczność dla komórek ssaczy.

Prowadząc własne badania nad regulacją genów w różnych układach, wykorzystując model drożdżowy, wykryliśmy nieznaną właściwość ujemnego sprzężenia zwrotnego w układach genowych. Ujemne sprzężenie zwrotne to jest rodzaj regulacji, kiedy pewne białko regulatorowe (dalej *supresor*) kontroluje ekspresję własnego genu poprzez wiązanie się do swojego promotora (Ryc. 2A). Wykazaliśmy, że w przypadku, gdy aktywność regulatorowa takiego supresora jest ściśle zależna od dodanej do systemu substancji chemicznej (dalej *induktor*, Ryc. 2B), poziom ekspresji genu supresora oraz wszystkich innych regulowanych przez niego genów jest liniowo proporcjonalny do poziomu dodanego induktora (Ryc. 2C). Wykorzystując modelowanie obliczeniowe oraz symulacje komputerowe stwierdziliśmy, że cecha ta powstaje poprzez podwójną dystorsję zależności między komponentami systemu. Pierwsza dystorsja występuje jako zależność nieliniowa poziomu supresora niezwiązanego z induktorem od poziomu dostępnego induktora

w systemie. Następnie druga dystorsja następuje dzięki dokładnie odwrotnej nieliniowej zależności ogólnego poziomu ekspresji genu supresora od poziomu supresora niezwiązanego (Ryc. 2D). Innymi słowy, można powiedzieć, że dzięki temu, że supresor hamuje ekspresję własnego genu, to w nieobecności induktora syntezowany on jest na *minimalnie możliwym* poziomie do prawidłowego funkcjonowania supresji. Natomiast induktor, po dodaniu do systemu, wiąże się z białkiem supresora, powodując osłabienie supresji i pozwalając na zwiększenie ekspresji genu supresora, ale tylko do poziomu *dokładnie wystarczającego*, żeby zrównoważyć ilość dodanego induktora i przywrócić prawidłowe funkcjonowanie supresji. Dzięki tym cechom powstaje więc liniowa zależność ilości supresora od koncentracji induktora w zakresie 80-90% od maksymalnego poziomu (Ryc. 2E).

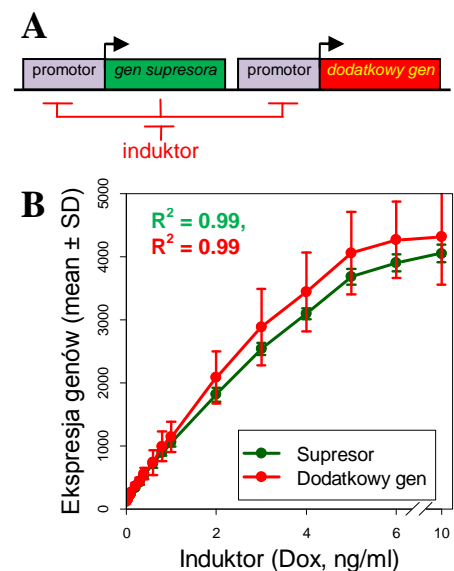
Należy podkreślić, że podobna podwójna dystorsja jest wykorzystywana w elektrotechnice do otrzymania sygnałów linowych w układach wejścia-wyjścia z nieliniową wydajnością, ale zjawisko to nie było do tej pory znane w systemach biologicznych. Ważną właściwością systemu, przewidzianą na podstawie komputerowego modelu oddziaływań a następnie sukcesywnie potwierdzoną w eksperymentach biologicznych było to, że wszystkie geny kontrolowane z wykorzystaniem promotora identycznego do owego supresora mają także liniową zależność między ilością dodanego induktora a poziomem ekspresji.

Szybko zdaliśmy sobie sprawę z potencjalnego zastosowania tego odkrycia, bo jak już zostało wspomniane, systemy zbudowane na podobnych zasadach mogłyby być przydatne do wykorzystania w terapii genowej oraz jako narzędzie do podstawowych badań biologicznych. Ale zanim stałoby się to możliwe, należałoby zaadaptować ten system do prawidłowego funkcjonowania w komórkach ludzkich i innych ssaków.

Badania w tym kierunku zaczęliśmy od budowy najprostszego prototypu, wzorowanego na wcześniejszych układach sprawdzonych w komórkach drożdżowych. Wykorzystując techniki biologii molekularnej oraz korzystając ze wskazówek wynikających z modelowania komputerowego, stopniowo zoptymalizowaliśmy system do bardziej efektywnego funkcjonowania w komórkach ssaczych. Optymalizacja ta obejmowała stworzenie nowych promotorów syntetycznych oraz zastosowanie elementów polepszających transkrypcję, translację i lokalizację białka supresora. Po stworzeniu szeregu prototypów, otrzymaliśmy system, który w komórkach ssaczych ma funkcjonalność podobną do układu drożdżowego, mianowicie liniową zależność ekspresji supresora oraz dodatkowych regulowanych genów od poziomu induktora (Ryc. 3A, B).

Mamy nadzieję, że stworzony przez nas system do precyzyjnej kontroli ekspresji genów w komórkach człowieka będzie w przyszłości wykorzystany w terapii genowej oraz w podstawowych badaniach biologicznych. Jedną z zalet naszego systemu jest możliwość kontroli poziomu ekspresji genu poprzez zastosowanie doksycykliny, dobrze zbadanego oraz powszechnie stosowanego w klinice leku.

Kontynuując badania w tym kierunku, jesteśmy w trakcie budowy systemów drugiej generacji, z wykorzystaniem dwustopniowej regulacji hybrydowej zarówno na poziomie transkrypcji i translacji białka. Jednocześnie pracujemy nad zmniejszeniem rozmiarów wektorów oraz optymalizacją metody modyfikacji genetycznej komórek dla ułatwienia ewentualnego wykorzystania układu w praktyce. Możliwe, że dalsze badania w tym kierunku pomogą nam też lepiej zrozumieć oddziaływanie oraz interakcje różnych elementów regulatorowych mających wpływ na proces ekspresji genów człowieka i innych ssaków.



Ryc. 3. W komórkach ludzkich ze stale wprowadzonym do genomu układem na podstawie ujemnego sprzężenia zwrotnego (A) ilość ekspresji supresora oraz dodatkowego regulowanego genu (mierzona z użyciem cytometrii przepływowej) jest liniowo proporcjonalna od koncentracji induktora w zakresie do 60% maksymalnej ekspresji (B).