



EUROPEAN  
COMMISSION

Community research



# Synthetic Biology Applying Engineering to Biology

Report of a NEST High-Level Expert Group

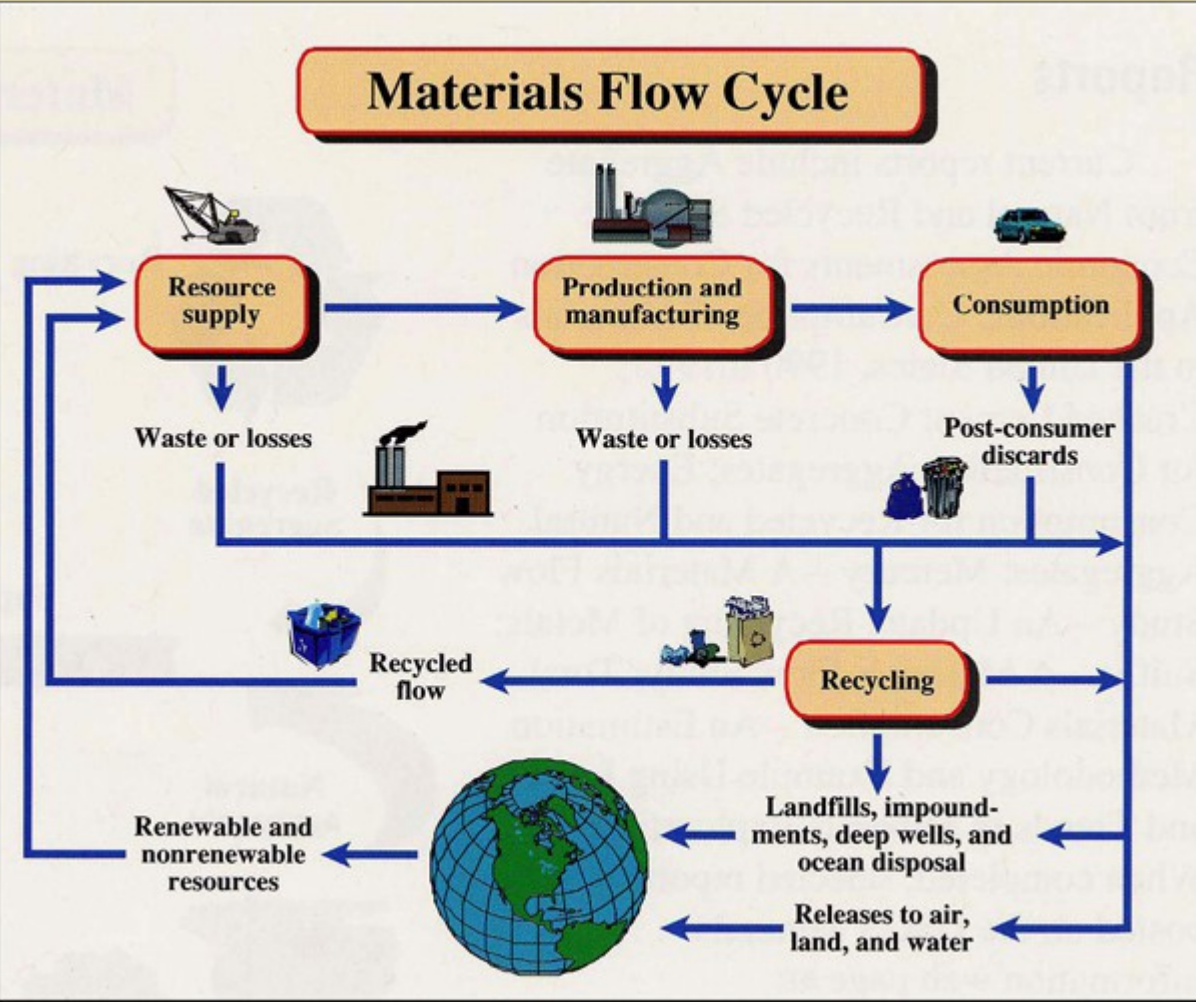
EUR 21796

## ***What can the field deliver?***

Synthetic biology will drive industry, research, education and employment in the life sciences in a way that might rival the computer industry's development during the 1970s to the 1990s.

Due to the fundamental change in methodology that it entails for the modification of living organisms, synthetic biology may be able to fulfil many of the promises that traditional biotech is still struggling to fulfil, in such important areas as:

- Biomedicine
- Synthesis of biopharmaceuticals
- Sustainable chemical industry
- Environment and energy
- Production of smart materials and biomaterials
- Security: counter-bioterrorism



<http://minerals.er.usgs.gov/plan/2006-2010/goal4.html>

## Potrebe po novih reagentih in materialih

Pri kemikalijah je trend usmerjen v iskanje (novih) obnovljivih virov. Ti bi lahko temeljili na bioloških molekulah, pri čemer bi vzpostavili zaporedje pretvorb, kjer bi vsako stopnjo v pretvorbi opravil nek določen inženirsko pripravljen mikroorganizem.

Gospodarstvo rabi prekursorje za kemikalije z visoko dodano vrednostjo (,comodity chemicals'), pri čemer so nekateri prekursorji lahko osnova za pripravo različnih končnih produktov (,platform chemicals'), npr. etilen, propilen, butadien za sintezo plastičnih mas.

Fine kemikalije (,fine chemicals') pogosto proizvajajo različni organizmi. Tudi zdravilne učinkovine so v več kot polovici primerov naravni produkti, npr. sekundarnega metabolizma.

Nekateri proteini imajo fizikalne lastnosti (trdnost, razteznost), ki so za uporabo primernejše kot so lastnosti sinteznih polimerov – primer pajkove niti. Posebno področje so pametni materiali (,smart materials'), to so snovi, ki se prilagajajo /odzivajo na prisotnost nekega stimulusa (npr. spremembe v okolju), ta sprememba pa je reverzibilna.

Biomateriali so snovi iz naravnih sestavin (npr. aminokislin), po drugi definiciji pa tudi vse snovi (razen živil in zdravil), ki jih lahko uporabljamo v diagnostiki in za zdravljenje bolezni. Za ekonomično sintezo novih reagentov in materialov je treba v organizme vnesti nove sintezne metabolične poti, pri čemer izbor genov za potrebne encime temelji na lastnostih potrebnih metaboličnih encimov za izvedbo reakcijske sheme (regulacija / negativne povratne zanke!). Gostiteljski organizem je običajno mikrob, ki že vsebuje velik del potrebnega vezja za sintezo novih želenih tipov molekul.

Prednost sinteznobiološkega pristopa v metaboličnem inženirstvu je, da je mogoče vse pretvorbe izvesti v isti celici in zato odpade čiščenje vmesnih stopenj v biokatalitičnem postopku, ki poteka v različnih mikroorganizmih. Razen tega je mogoče biosintezno pot začeti iz najpreprostejših gradnikov, medtem ko kemijske pretvorbe običajno začenjajo z bolj kompleksnimi reagenti.

## Uvedba novih metaboličnih poti

Za razliko od biotehnološke proizvodnje rekombinantnih proteinov je pri metaboličnem inženirstvu treba zagotoviti ustrezno nizke (ne pa čim večje) ravni izražanja posameznih genov za encime, ki katalizirajo biosintezo. Prekomerno izražanje bi pomenilo metabolično breme za celice, saj bi šlo veliko gradnikov in energije v sintezo nukleotidov (za RNA) in aminokislin (za proteine), ki niso nujno potrebni.

Ker so intermediati metaboličnih poti v večjih koncentracijah za celice lahko toksični, morajo biti koncentracije encimov usklajene, da se intermediati ne akumulirajo do toksičnih ravni.

Šasija za izvedbo mikrobne kemijske tovarne (microbial chemical factory) mora imeti naslednje lastnosti:

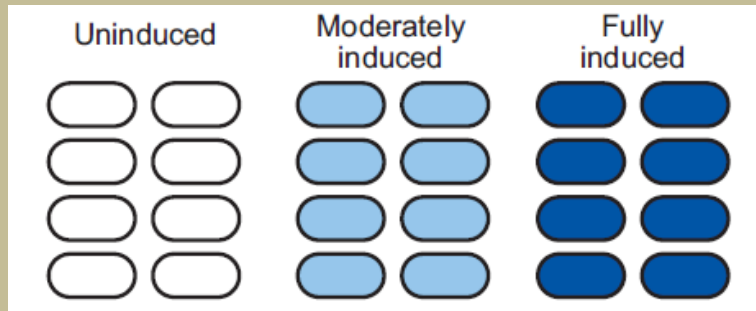
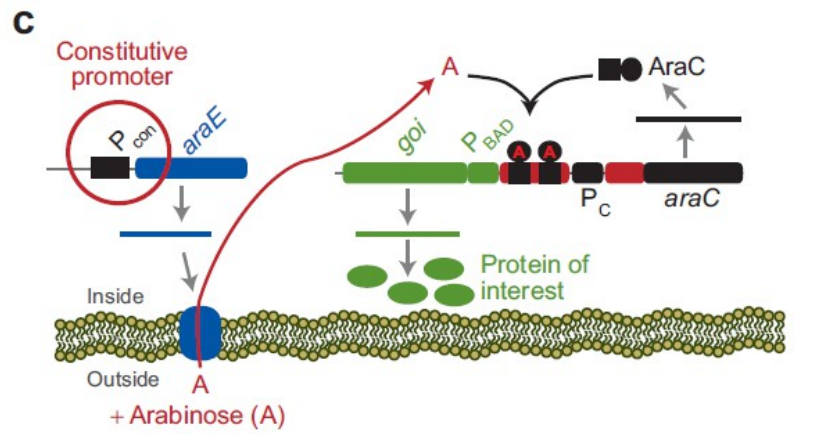
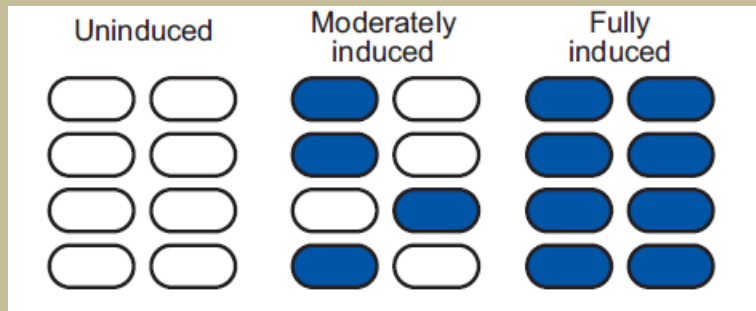
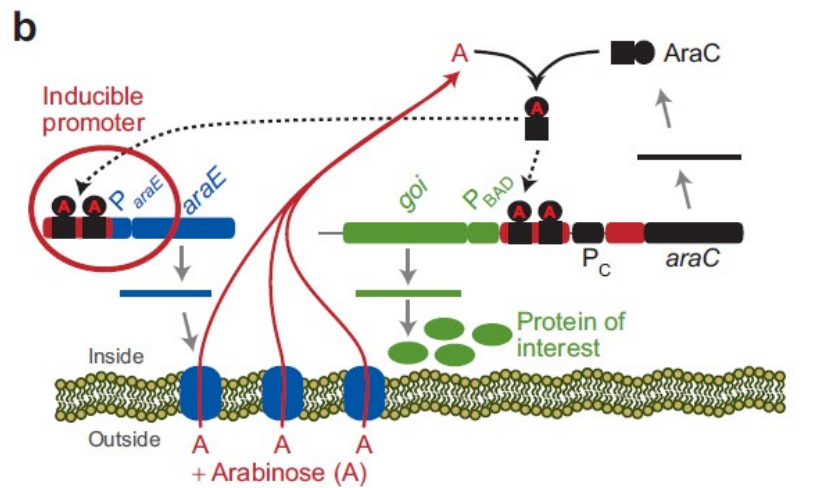
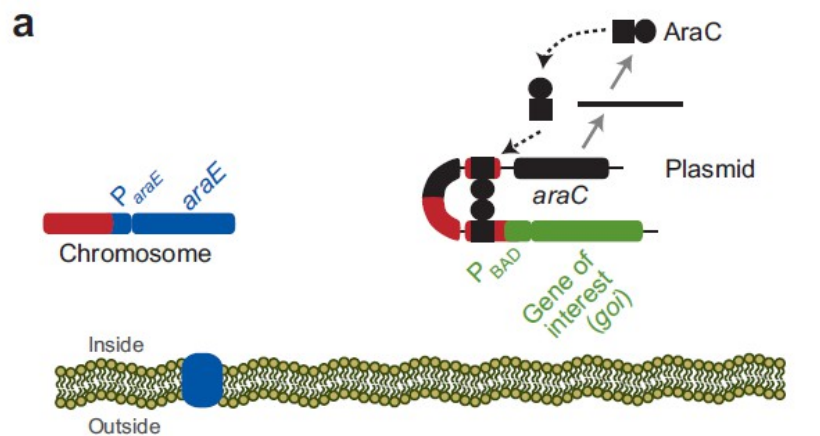
- genetska stabilnost tudi pri dolgotrajni proizvodnji (vektor in gostiteljski genom se ne preurejata, vektor se ne izgublja),
- celice rastejo v čim enostavnejšem in zato poceni gojišču, da so proizvodni stroški čim nižji, in morajo biti dovolj robustne, da med gojenjem ne pride do motenj v rasti zaradi sprememb v gojišču in metaboličnega bremena/stresa,
- šasija mora omogočati popolno kontrolo nad indukcijo genov, tako da ne more priti do akumuliranja toksičnih snovi,
- izražanje več encimov v biosintezni poti mora biti usklajeno,
- obstajati bi moral CAD-sistem za modeliranje, uporabljeni biološki deli pa bi morali biti dobro opisani,
- razviti bi morali biti postopki za reševanje problemov (biological debugging routine).

Vektorji naj bi bili stabilni in prisotni v čim manjšem številu kopij (metabolično breme), število kopij na celico pa naj bi bilo čimbolj enakomerno. Vektorji naj bi imeli tudi čimvečjo kapaciteto, da je vanje mogoče vstaviti tudi kompleksna genska vezja. Večjo stabilnost lahko dosežemo z vstavitvijo na kromosom.

Številni inducibilni promotorji omogočajo le odziv ‚vse ali nič‘ znotraj neke celice, a v mejnih koncentracijah niso inducirane vse celice v kulturi. To pomeni, da bodo nekatere celice pod večjim metaboličnim stresom in tiste, ki bodo proizvajale rekombinantne proteine, bodo rasle počasneje od tistih, ki bodo neaktivne. To ni primerno takrat, ko ima protein več podenot, ki se morajo usklajeno izražati.



AraC: regulator izražanja  
 AraE: transporter



## Alternativni promotorji za metabolično inženirstvo

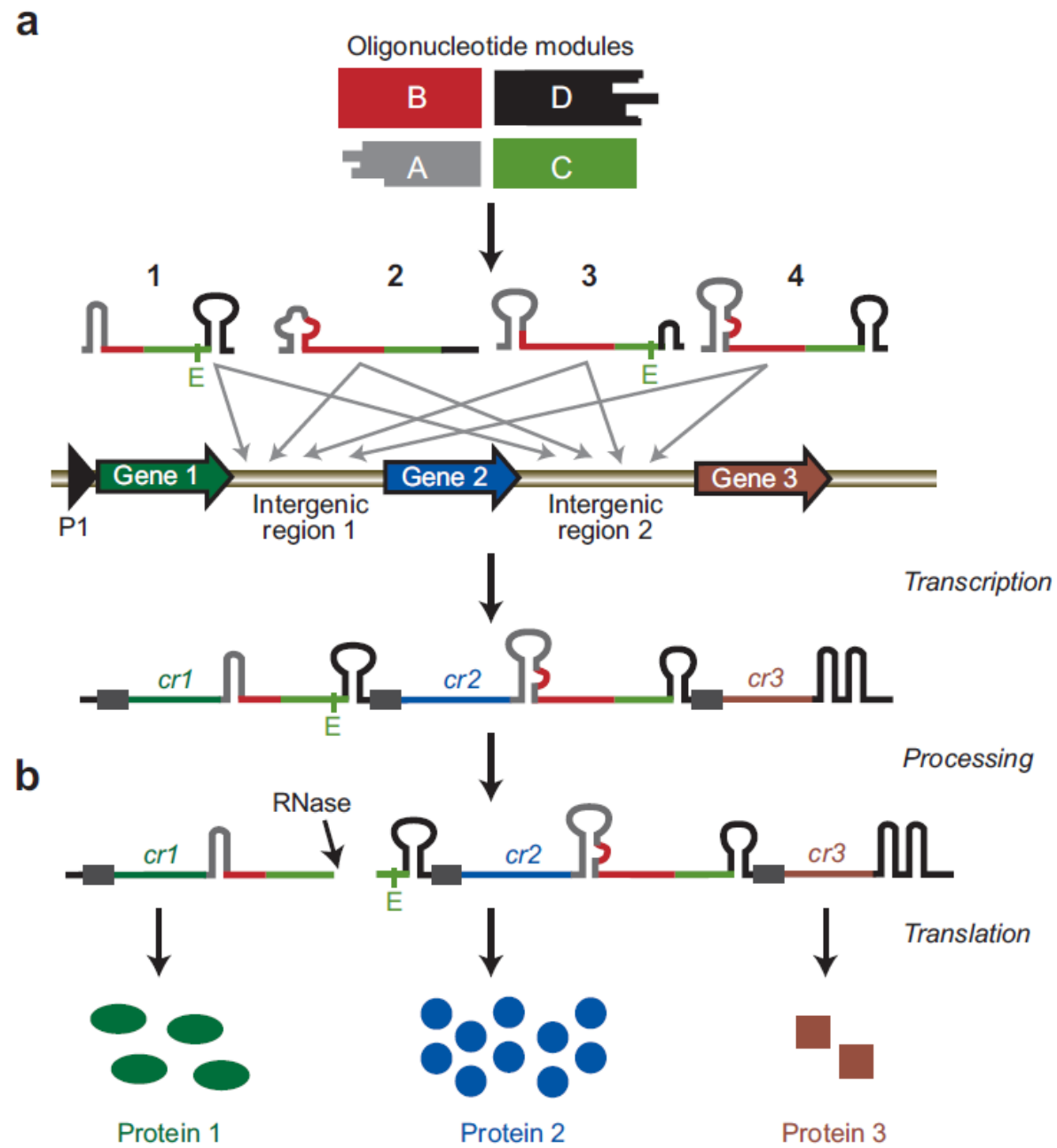
Optimalno je, da induktor ne rabi posebnega transporterja (npr. IPTG) ali da izražanje transporterja ni avtoregulirano (npr. propionat), ali pa da induktor ni neka molekula, pač pa sprememba pogojev v gojišču (npr. pomanjkanje fosforja) ali ko celice dosežejo stacionarno fazo rasti.

Promotorji, ki se odzivajo na pomanjkanje v gojišču so lahko samo popolnoma vključeni ali popolnoma izključeni, kar onemogoča natančno regulacijo izražanja. Nekateri promotorji tega tipa se tudi ne izključijo, ko se pogoji v okolju vrnejo v normalno stanje.

Za proizvodnjo preprostih reagentov lahko uporabimo konstitutivne promotorje, pri katerih induktor ni potreben (ne predstavlja stroška). Moč konstitutivnih promotorjev je mogoče spreminjati z uvajanjem mutacij v regiji -10, -35 in 16 bp v vmesni regiji.

Koordinirano izražanje več genov lahko dosežemo na različne načine:

- vsak gen je pod kontrolo drugega promotorja (slabo, ker rabimo več različnih induktorjev),
- uporabimo inženirsko spremenjene promotorje, ki zagotavljajo različno močno izražanje ob uporabi istega induktorja,
- uporabimo nenaravne promotorje ali nenaravno RNA-polimerazo (genetsko spremenjena podenota sigma),
- gene povežemo v umetne operone z usklajenim izražanjem (uporabimo tudi notranje RBS),
- ravni sinteze proteinov reguliramo na posttranskripcijski ravni (stabilnost mRNA, iniciacija translacije),
- uporabimo intergenske regije, ki imajo regulatorno funkcijo (TIGRs – tunable intergenic regions).



## Pretvorba koruznega sirupa v 1,3-propandiol (PDO)

CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> uporabljajo kot topilo, za sintezo poliuretana, poliestrov itd. Obstaja kemijski način sinteze (iz propilena ali etilen oksida) in več biotehnoloških postopkov.

- a) iz glicerola s *Clostridium diolis* in z enterobakterijami
- b) iz koruznega sirupa (maltoza + oligosaharidi iz škroba) z GS *E. coli* (proizvodnja 2007: 120.000 t, DuPont; ACS: „2007 Heroes of Chemistry“) → BioPDO

### Zasnova metabolične poti:

Kvasovke in številne bakterije so sposobne anaerobno fermentirati glicerol v dvostopenjski reakciji: pretvorba glicerola z dehidratazo do 3-hidroksipropionaldehida in vode, nato pa redukcija z ustrezno oksidoreduktazo, odvisno od NAD<sup>+</sup>, do PDO.

Alternativna pot je z oksidacijo do dihidroksiacetona z dehidrogenazo, sledi fosforilacija s kinazo in pretvorba v PDO.

*Klebsiella pneumoniae* in *Citrobacter freundii* imata potrebne gene za pretvorbo na istem regulonu:

glycerol dehidrataza (dhaB), 1,3-propandiol oksidoreduktaza (dhaT), glicerol dehidrogenaza (dhaD), dihidroksiaceton kinase (dhaK)

Prenos v *E. coli* je privedel do uspešne biosinteze PDO, a je bila raven proizvodnje nizka zaradi številnih motečih dejavnikov. Razviti je bilo treba povsem nov sistem za proizvodnjo v velikem merilu.

Pripravili so kozmidni vektor, v katerega so vstavili 35 kb iz genomske knjižnice *K. pneumoniae*, s pripravljenim konstruktom so transformirali *E. coli*, ki so pretvarjale glukozo v PDO. Učinkovitost so izboljšali z uvedbo več mutacij (naključna mutageneza).

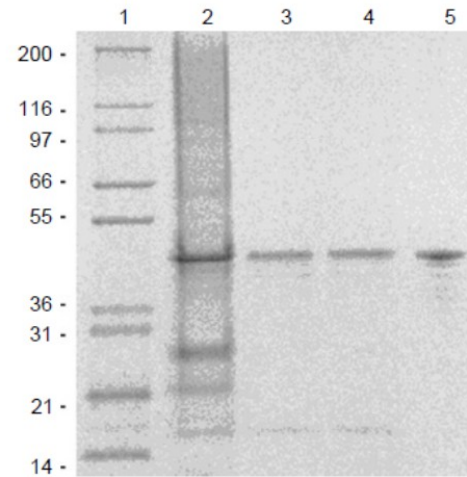
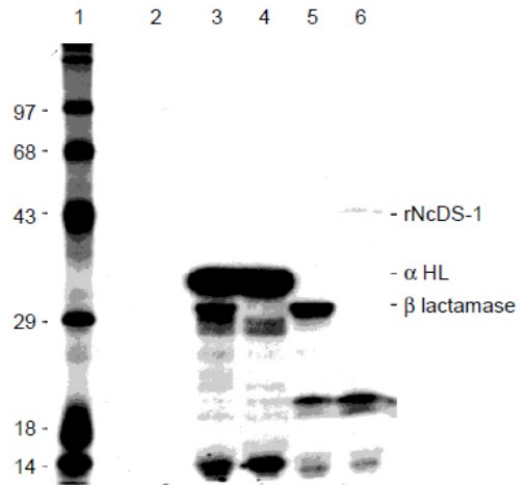


## Proizvodnja pajkove svile v *E. coli*

Pajkova nit je v osnovi proteinski polimer, ki ga sestavljajo podenote z visoko vsebnostjo Pro in pretežno helikalno strukturo. Ta svila se lahko raztegne na 4x dolžino niti, njena čvrstost pa presega kevlar.

Proizvodnja pajkovega proteina s ponavljajočimi se zaporedji je bila v mikrobih nizka tudi zaradi neustrezne rabe kodona, zato so pripravili sintezni gen.

35



**Fig. 3** Coupled in vitro transcription/translation from pT7 constructs in *E. coli* S30 extract. Reactions were supplemented with 50 U T7 RNA polymerase and, in some cases, with rifampicin to 20 µg/ml. [<sup>3</sup>H]leucine-labelled proteins were detected by fluorography after separation on a 10% TRIS/glycine gel. Lane 1 <sup>14</sup>C-labelled protein molecular mass standards, high range (Gibco-BRL), in kDa; S30 extract with (2) no plasmid, (3) pT7-HL minus rifampicin, (4) pT7-HL plus rifampicin, (5) pT7-NcDS-1 minus rifampicin, (6) pT7-NcDS-1 plus rifampicin

**Fig. 5** Sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis analysis of purified recombinant silk protein rNcDS-1 by Coomassie blue staining. Samples were run on a 10%–20% Tricine gel (Novex). 1 Mark 12 standards (Novex), in kDa; 2 nickel-nitriloacetate-affinity-purified; 3 dialyzed into 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TRIS/Cl, pH 8, 20 mM NaCl; 4 dialyzed into distilled deionized water; 5 HPLC-purified. All samples represented the soluble fraction of each step. Western blot analysis using the dragline silk antibody confirmed the target protein to be silk-like

## Biosinteza artemizinske kisline v *S. cerevisiae*

Artemizinin kot najučinkovitejše sredstvo proti malariji je naravna učinkovina iz sladkega pelina (*Artemisia annua*). Da bi zagotovili dovolj surovine za nadaljnjo kemično pretvorbo v zdravilno učinkovino, so v kvasovko vstavili biosintezo pot, ki se je končala z artemizinsko kislino.

Inženirsko preurejena mevalonatna pot v kombinaciji z amorfadien sintazo in citokrom P450 monooksigenazo je omogočila proizvodnjo do 100 mg/l produkta, ki se je izločal iz celic.

