



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Syntetisk Biologi

Metoder och applikationer för den nya tidens  
molekylärbiologi

Anders Lind

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

# Syntetisk biologi

Anders Lind

Självständigt arbete i biologi 2010

## Sammandrag

Syntetisk biologi är ett av de heta ämnena inom molekylärbiologin idag. Mycket forskning bedrivs inom området och de stora genombrotten har det rapporterats om på förstasidor i de stora dagstidningar, något som inte är helt vanligt när det kommer till vetenskapliga nyheter. Den syntetiska biologin är speciell på så sätt att den än så länge nästan helt jobbar inom områden som inte klassas som liv. Man kan dela in den i två delar. En del involverar arbete på genom-nivå, med ett mål att besvara på frågan hur det minimala genomet ser ut. En annan del rör frågan om livets uppkomst. Hur såg den första formen av liv ut på jorden. Vilka var dess bestånds-delar, och kan vi återskapa en sådan cell.

Förutom arbetet med att ge svar några av de stora frågorna inom evolutionsbiologin så har även syntetisk biologi en stor potential för biotech-industrin. Att använda sig av mikroorganismer för industriella applikationer är inte ovanligt idag, men med hjälp av den syntetiska biologin så kan detta fält utökas avsevärt. Om vi kan nå ett stadie där vi kan konstruera celler, liv om man så vill, ifrån delar tagna från alla tre domäner av liv kan oerhört intressanta applikationer uppstå.

Här kommer jag att försöka förklara de två stora angreppssätten till syntetisk biologi. Botten-upp metodiken som används för att försöka konstruera en minimal cell samt uppifrån-ned metoden som istället försöker dekonstruera genomet till sitt absoluta minimum. Båda tillvägagångssätt har sina hinder att överkomma, men tillsammans kan de koma att leda till något revolutionerande. Detta medför som alla stora upptäckter problem och ifrågasättande av de etiska implikationer som det medför.

## Inledning

”Det jag inte kan bygga, kan jag inte förstå” är ett citat av den amerikanska fysikern Richard Feynman som ofta brukar komma fram då man skall prata om syntetisk biologi. Idag så saknar vi en komplett bild av vad som krävs för att upprätthålla en livsduglig livsform. Även om vi känner till mycket av cellens biologi, och framför allt det sätt som information (DNA) förs från en generation av celler till nästa har vi fortfarande inte förstått all delar.

Men trots att vi idag både snabbt och till en relativt billig kostnad kan sekvensera organismers arvs massa i sin helhet så känner vi inte till funktionen av många av de hypotetiska proteiner som en organism kodar för, eller om det faktiskt är en kodande sekvens (Clamp *et al.* 2007). Inom området syntetisk biologi så är detta väldigt problematiskt. Målet med mycket av den syntetiska biologin är att skapa en organism som endast har de absolut nödvändiga funktioner för cellulärt liv. Ett sorts skal som kan fungera på samma sätt som chassit på en bil. Något vi kan bygga upp organismer kapabla att utföra komplex kemisk syntes. Dessa små ”bio-fabriker” skulle kunna producera många av de ämnen som vi idag måste framställa på kostsam kemisk väg. De skulle kunna fungera som bio-sensorer (Gu *et al.* 2010) eller vara verktyg för bioremediering (de Lorenzo 2008).

Den syntetiska biologin har fött fram bland annat på grund av att sekvensering av DNA drastiskt har sjunkit i pris det senaste årtiondet, vilket har lett till en explosion i antal

sekvenserade hela genom (Venter 2010). Detta har tillåtit forskare att jämföra organismers arvs massa och kartlägga gener och deras protein eller RNA produkt. Från dessa har det sedan vuxit fram en idé om att det går att sammanfoga bitar av DNA till en helhet som kan utföra uppgifter som ingen naturlig organism kan (Purnick & Weiss 2009).

### **Begreppet syntetisk biologi**

Det är inte alltid helt lätt att sätta fingret på vad begreppet syntetisk biologi betyder. Det är ett uttryck som används inom många olika delar av biologin, och de har inte alltid samma innebörd. Exempelvis så kan artiklar som handlar om syntesen av DNA på kemisk väg betecknas som syntetisk biologi, och samtidigt kan en artikel om genetiskt modifierade organismer referera till sig själv på samma sätt. Detta speglar att området är nytt och en standardiserad nomenklatur har inte infunnit sig än.

I den här uppsatsen så har jag valt att definiera syntetisk biologi som konstruktionen av biologiska system som inte går att finna i naturen.

Ämnet kan delas upp i flera delar. Den här uppsatsen kommer att fokusera på två tekniker inom områden. Dessa brukar benämnas som botten-upp och uppifrån-ned.

Båda dessa tekniker har en minsta gemensamma nämnare. Både avser att besvara frågan ”Hur reducerad kan en cell vara men ändå vara livsduglig?”. En naturlig cell idag, oavsett om man talar om en eukaryot eller prokaryot cell, är en organism som har utvecklats under miljontals år. Maskineriet som driver en cell är en oerhört komplex, och dåligt förstådd, process. Även de mest reducerade organismer vi känner till idag består av 100-tals gener och deras tusentals protein och RNA produkter.

Om man tar exemplet med bakterien *Mycoplasma genitalium*, den minsta frilevande organism (med avseende på arvs massa) vi känner till idag, så har den ett genom på endast 580 kbp med 470 kodande regioner och 37 gener för RNA produkter så som rRNA och tRNA (Fraser *et al.* 1995). Värt att notera är att cirka en tredjedel av dessa gener kodar för en produkt med okänd funktion. Denna organism är frilevande men lever som parasit på sin värd, ett skäl till varför den har tappat många av de gen-kodade funktioner den en gång kanske hade. Det finns exempel på organismer med ännu mer reducerade genom. Man har till exempel hittat en bakterie vid namn *Carsonella ruddii* vars arvs massa inte är mer än 160 kbp (Nakabachi *et al.* 2006). Detta är dock ett något speciellt fall då denna bakterie är en endosymbiont hos bladlöss. Mycket av det material cellen behöver för att överleva kodas alltså inte av endosymbionten, utan av dess värd. Denna bakterie har med andra ord inga som helst möjligheter att leva utanför sitt värd. Detta kan liknas vid mitokondrien som en gång i tiden också var en frilevande  $\alpha$ -proteobakterie (Gray *et al.* 1999).

I ett försök att kartlägga vilka gener som var de absolut essentiella så utfördes ett experiment där gener systematiskt slogs ut med hjälp av transposon insättningar. Detta visade att 100 av de 470 kodande regionerna kunde slås ut men ändå producera en livsduglig cell (Glass *et al.* 2006). Man kan tänka sig att detta går att vidareutveckla en bit. Det är inte en så svårt att tänka sig ett scenario där man slår ut gen A och gen B separat och i båda fallen visar sig cellen vara livsoduglig, men om man slår ut A+B så kan cellen fungera. Försöket har alltså inte visat det minsta möjliga uppsättningen som är möjlig, men det är ett bra steg på vägen.

## Uppdelning av fältet

Det finns två primära sätt att bemöta begreppet syntetisk biologi. Man kan se på cellen som en helhet och experimentellt försöka ta reda på vad man kan ta bort från dess genom, men fortfarande få en livsduglig cell. Detta är metoden som har använts i exemplet ovan av Glass *et al.* 2007 och som brukar kallas för toppen-ned metoden.

Man kan även utgå från att det någon gång under evolutions begynnelse fanns en cell som var förmögen att utföra de processer som krävs för att definieras som liv (se text-box), och detta med att absolut minimum av beståndsdelar. Att försöka återskapa en sådan cell är vad man vill åstadkomma med botten-upp metoden. Jag ämnar att med denna uppsats göra ett försök att förklara vad som menas med dessa två, vilka tekniker man använder sig av samt hur långt man kommit med detta arbete.

## Uppifrån-ned

Exemplet med att systematiskt slå ut generna i en organisms arvs massa med hjälp av transposoner visar på ett så kallat uppifrån-ned tänkande. Man börjar med en naturligt förekommande organism och dess genom, och genom förändringar i detta försöker man att gradvis jobba sig ned emot den minsta möjliga uppsättningen gener som krävs för att upprätthålla liv. Man kan argumentera att detta inte handlar om någon ny syntetisk biologi utan om klassisk genetisk ingenjörskonst. När man idag talar om att skapa ett syntetisk minimalt genom är det inte genom att slå ut gener på klassiskt manér, utan att syntetisera hela genomet på kemisk väg.

Att på artificiell väg skapa DNA och gener är något som varit möjligt redan sedan 1970-talet. 1977 så syntetiserades och uttrycktes genen för somatostatin (Itakura *et al.* 1977) och 1978 så lyckades man syntetisera genen för mänskligt insulin (Crea *et al.* 1978). Redan året efter så hade man även lyckats att uttrycka genen i *E. coli* (Goeddel *et al.* 1979). Detta ledde i sin tur att folk med diabetes kunde börja injicera humant insulin istället för insulin som extraherats från djur, i synnerhet gris. Detta är ett tidigt exempel på de fördelar som finns i syntetisk biologi. Att kunna ta delar från ett system och använda sig av dessa i ett annat. Det första kompletta syntetiska genomet skapades 2003 när man på kemisk väg skapade en komplett kopia av bakteriofagen  $\phi$ X174 (Smith *et al.* 2003). Detta virus hade ett genom bestående av endast 5386 bp. Trots att  $\phi$ X174 har ett sådant litet genom så var det trots allt en stor uppgift att producera en helt syntetisk motsvarighet.

1977 när man framställde insulin-genen syntetiskt så var tekniken för att producera syntetiskt DNA begränsad. Långsamt och metodiskt så byggdes hela sekvensen på 181 bp (77 bp för  $\alpha$ -kedjan och 104 bp för  $\beta$ -kedjan) upp från enstaka nukleotider.

Idag kan man beställa fragment på upp till 35-40 kb från företag som DNA 2.0 och GENEART. Något som självklart underlättar arbetet på labbet avsevärt. 40 kb är dock fortfarande en bra bit ifrån de 4,6 Mb som utgör *E. coli* genomet eller de 3,4 Gb som utgör vår egen mänskliga arvs massa. Man skall dock komma ihåg att även dessa fragment sätts samman från mindre oligonukleotider

### Liv: En definition

Att hitta en definition av liv i den tryckta litteraturen är inte helt lätt. Den i modern tid vanligt förekommande varianten är den NASA tog fram för sina exobiologiförsök under tidigt 1990-tal:

*"Liv är en självförsörjande kemisk process som är utsatt för darwinistisk evolution"*.

En modernare definition är:

*"Ett system som är självförsörjande genom att använda sig av extern energi och näringsämnen i sin egen interna produktionsprocess och sammanlänkad till sitt medium genom anpassningar som är beständiga över tid" (Luisi 1998).*

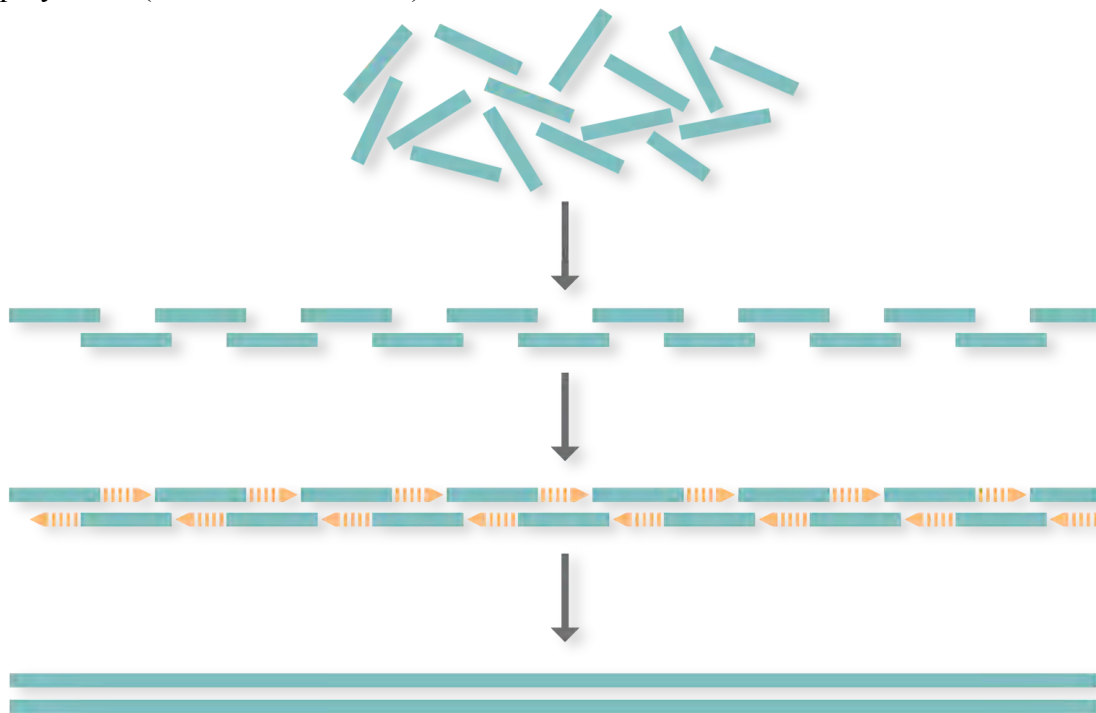
Båda definitioner har sina egna problem, att försöka klargöra vilken som är den bättre ligger utanför ramarna för denna uppsats.

## Långa sekvenser

Företag som säljer syntetiskt DNA erbjuder väldigt långa sekvenser, men alla metoder bygger fortfarande på sammanfogandet av kortare oligonukleotider. Dessa oligonukleotider framställs på kemisk väg och kan idag skapa oligonukleotider på upp till 100 baser. För läsare intresserade av att veta mer om hur denna process går till så hänvisar jag till Caruthers, 1985.

Att sätta ihop en syntetisk gen är inte alltid en självklarhet. Det finns många variabler som man måste ta hänsyn till. En uppenbarsådan är att om man vill uttrycka en gen från en viss organism i t.ex. en modellbakterie som *E. coli* så är det inte alltid en självklarhet att det kommer att fungera. Även om det idag lätt går att hitta tabeller som översätter de olika kodonen till aminosyror så har olika organismer en benägenhet att favorisera vissa kodon framför andra (Gouy & Gautier 1982). Detta är särskilt viktigt för proteiner som uttrycks till hög grad, vilket ofta är vad man vill uppnå inom bioteknologin. Idag så erbjuder företag som specialiserar sig på DNA-syntes mjukvaruverktyg för att kodon-optimera sekvenser till en särskild organism (Villalobos *et al.* 2006).

Ett annat stort problem är introduktioner av mutationer vid syntesen av DNA. Eftersom de metoder som används vid framställande av längre genfragment bygger på förlängning av överlappande oligonukleotider, inte helt olik från vanlig PCR, introduceras mutationer av DNA-polymeraset. Den klassiska metoden brukar kallas för "polymerase chain assembly" (PCA, fig. 1) och bygger på en stor mängd korta syntetiska oligonukleotider med överlappande delar som fäster till varandra och görs kompletta genom förlängning med DNA polymeras (Stemmer *et al.* 1995).



Figur 1. Stegen i en PCA reaktion. Små överlappande bitar enkelsträngat DNA fogas samman och mellanrummen fylls i utav DNA polymeras.

Problem uppstår när det finns fel i de oligonukleotider man använder som startmaterial. Enstaka felaktiga baser, raderade baser eller felaktig längd på oligonukleotiderna kan skapa stora problem. Ett exempel på detta var de försök som gjordes att skapa ett komplett

syntetiskt genom av *Mycoplasma mycoides*. Där ledde en enda raderad bas i genen *dnaA* till att organismen blev helt livsoduglig (Gibson *et al.* 2010).

Flera metoder har utvecklats för att komma till rätta med den här problematiken. Prover kontaminerade med kortare än tänkta sekvenser kan renas med hjälp av gelelektrofores (Smith *et al.* 2003). Sekvenser som innehåller felaktiga baser kan avhjälpas på flera sätt. En metod som är föreslagen för att lösa detta är att använda sig av proteinet MutS.

Proteinet MutS har den egenskapen att det binder till dubbelsträngat DNA med fel-matchade baser (Su & Modrich 1986). Denna egenskap utnyttjas genom att man denaturerar och sammanfogar DNA och låter det sedan passera över immobiliserat MutS. Det DNA som innehåller fel-matchade baser renas då bort (Binkowski *et al.* 2005). Ett alternativ till detta är att skapa cirkulära fragment och behandla dessa med exonukleaser som klipper dubbelsträngat DNA vid fel-matchande baser. De fragment som innehåller fel kan då tas bort med hjälp av proteiner som bryter ned linjärt, men inte cirkulärt, DNA (Bang & Church 2007).

### **Sammanfogande och transplantation**

För att få ihop en komplett fungerande enhet så måste man fortfarande ha en metod för att sammanfoga alla de fragment som tillsammans utgör det kompletta genomet. Detta är något som inte är möjligt när vi pratar om arvsmassa i storleksordningen kompletta genom. För att göra detta så används jästen *S. cerevisiae*. Det har visat sig att denna jäst har en otrolig förmåga att sammanfoga överlappande bitar av DNA till en enda kontinuerlig enhet (Gibson *et al.* 2008). I det experiment som utfördes av Gibson *et al.* 2008 så lyckades en jästcell ligera 25 stycken bitar av överlappande, syntetiskt framställt, DNA med hjälp av homolog rekombination i en artificiell jäst kromosom. Här finns även en del begränsningar som man bör beakta. För att kunna upprätthålla ett komplett genom i en jästcell går det ej att direkt transplantera in en cirkulär prokaryot kromosom. För att jästcellen skall upprätthålla en komplett kopia så måste cellen känna igen det främmande DNA:t som en naturlig kromosom. Detta går att uppnå genom att till sitt prokaryota DNA tillföra de delar som kännetecknar en jästcells kromosomer, nämligen en centromer och en startpunkt för replikation.

En organisms arvsmassa, oavsett om det handlar om ett artificiellt eller naturligt sådant, är en väldigt stor molekyl (eller flera). Att extrahera denna ut ur en cell är något som har kunnat åstadkommas sedan länge (Pitcher *et al.* 1989) och idag går det att köpa färdiga kit för komplett DNA extraktion ur celler från företag som Sigma-Aldrich, Invitrogen och Bionline. Det är alltså inga problem att få ut syntetiskt DNA ur en jästcell. Men att extrahera DNA är bara halva biten. För att kunna använda detta som nytt genom i en organism måste man även få in det i en mottagar-cell. Skälet till varför grupper som arbetar med detta har valt att koncentrera sig på just *Mycoplasma* ligger just här i. Hos *Mycoplasma* saknas cellvägg vilket bör göra det enklare att transplantera in ett genom in i en sådan cell i jämförelse med en cell som är omgiven av en cellvägg (Lartigue *et al.* 2007).

Metoder för att få in DNA in i en cell finns det många, och det är även något som sker regelbundet hos prokaryoter i naturen (Lorenz & Wackernagel 1994). Vid laborativt arbete är transformering med hjälp av värmechock (Inoue *et al.* 1990) och elektroporerering (Dower *et al.* 1988) de vanligast förekommande. I båda dessa metoder är dock storleken på vad som går att transformera in i en cell begränsat.

Mekanismer för upptag av större bitar av DNA verkar dock inte helt saknas i naturen (Heidelberg *et al.* 2000) men gener för denna typ av mekanism har inte hittats hos *Mycoplasma* (Lartigue *et al.* 2007). Trots detta lyckades Lartigue med kollegor att transplantera genomet från *M. mycoides* in i en cell av *M. capricolum*. De åstadkom detta

genom en ännu inte helt klargjord mekanism. Vad de gjorde var att utsätta mottagarceller för en fusions-buffert innehållandes polyetylenglykol (PEG). PEG har visat sig ha de egenskaperna att det får *M. capricolum* celler att fusera med varandra (Tarshis *et al.* 1993). Den mekanism som är föreslagen för hur ett helt genom transplanteras in i en cell är att två *M. capricolum* celler fuseras och när detta sker så fångas ett fritt *M. mycoides* genom mellan dessa och inkorporeras i cellen (Fig. 2, Lartigue *et al.* 2007).

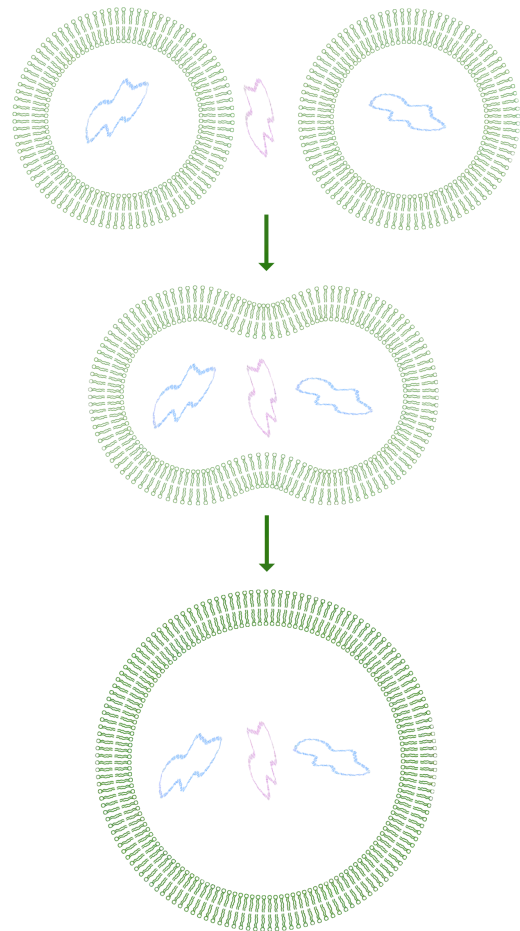
### Storleken har betydelse

Artificiella jäst-kromosomer har varit ett oerhört viktigt verktyg i framställandet av ett komplett syntetiskt genom, men även dessa har sina begränsningar. Den övre gränsen för storlek på fragment som kan placeras i en artificiell kromosom i jäst ligger runt 1-2 Mb (Monaco & Larin 1994). Detta har varit tillräckligt för det *M. mycoides* genom man framställt, men räcker inte till för merparten av de mikrobiella genomen som finns i naturen. Ett alternativt som lyftas fram för att komma runt detta är att tillverka artificiella kromosomer baserade på däggdjurs DNA (eng. *Mammalian Artificial Chromosome*, MAC). Kromosomer hos däggdjur, och andra ”högre” organismer är ofantligt stora om man jämför med prokaryoter. Det skulle alltså inte finnas några problem med vad gäller storlek på vad man vill klona. Det finns däremot många andra problem när det gäller artificiella däggdjurskromosomer. I jämförelse med jästkromosomer så vet vi mycket mindre vad gäller de mekanismer som är nödvändiga för replikation (Monaco & Larin 1994). Uppbyggnaden av centromerer och telomerer skiljer sig avsevärt när det gäller de båda systemen. De enzymatiska verktyg som man kan utnyttja när man arbetar med jästceller, vad gäller sammanfogandet av bitar av DNA till en helhet, är fortfarande inte beskrivet vad gäller däggdjurs-celler.

Arbetet med artificiella kromosomer från däggdjur har gett många insikter i hur den mänskliga cellcykeln fungerar (Larin & Mejía 2002). Och kanske kan man en dag nå till den punkt där man kan använda sig av dessa för att klona kompletta prokaryota genom, men det är fortfarande en lång bit kvar.

### Praktisk tillämpning

Vad Venter och hans grupp visade med sina experiment är att det går att syntetisera ett genom och få detta uttryckt i en mottagarcell. Det finns dock många hinder kvar innan detta kan tillämpas för att skapa en cell med ett helt reviderat genom. Alla försök som hittills gjorts har varit på *Mycoplasma* bakterier. För att fungera som en ersättare av traditionella genetiska verktyg måste systemet klara av att användas på i stort sätt alla typer av celler, och här kommer även problemen med genomstorlek in. För att svara på frågan hur pass reducerat ett



Figur 2. Föreslagen modell för genomtransplantation

genom kan göras men ändå vara livsuppehållande kan dock denna teknik komma att spela en avgörande roll.

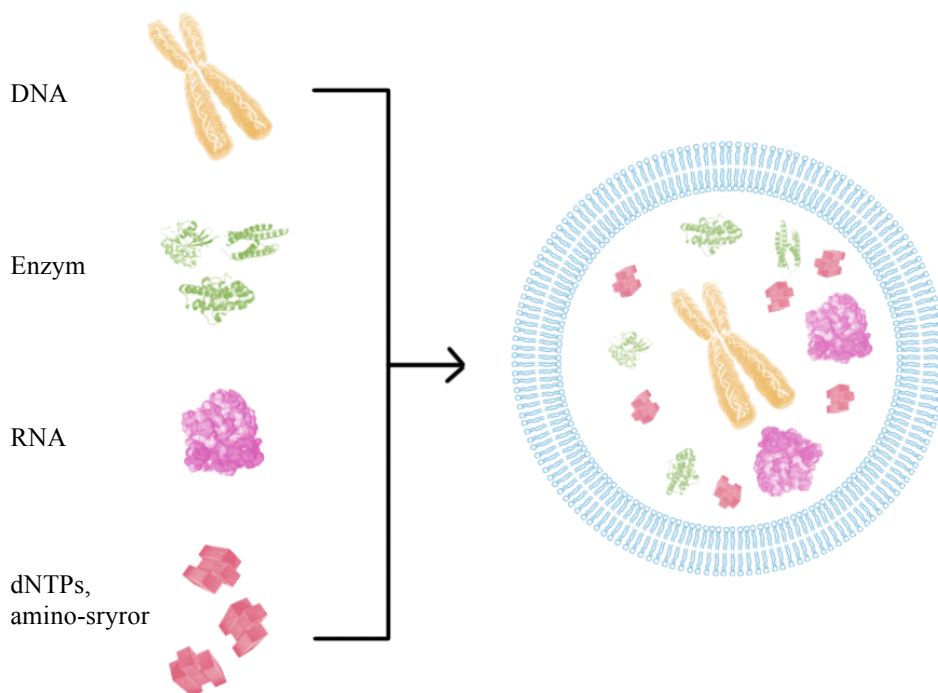
Vill man istället använda syntetiska genom som ritning för en skräddarsydd organism så måste en del andra problem lösas. Om man designar ett genom helt från början skulle ett slags start-cell kanske vara att föredra. Istället för att använda sig av en naturlig cell som start-material kanske man kan tillverka ett slags cellulär *tabula rasa*. En cell som är kapabel att transkribera och translatera det genom man injicerar det med. En sådan cell är vad man försöker åstadkomma med hjälp av botten-upp tekniker.

## Botten-upp

Ett alternativt sätt till att gradvis reducera en organisms arvs massa för att förstå vad som krävs, är att starta från den verkliga grunden. Att börja med noll och sedan lägga på del för del tills man slutligen uppnår en levande organism. Detta är ett fält som började redan på tidigt 60-tal när man lyckades skapa artificiella membran-strukturer kapabla att kapsla in protein-lösningar (Chang 1964). Men det finns även delade meningar om vad som är den bästa metoden. Skall man utgå från dagens celltyper och försöka göra en minimal sådan, eller ska man rikta blicken ännu längre bakåt och försöka återskapa de cellformer så som de såg ut vid livets uppkomst?

Svaret på denna fråga beror självklart på vad man vill uppnå med sin forskning. För evolutionsbiologer kan det vara intressant att veta hur livet såg ut då det uppstod på jorden. I detta fall så kanske man vill veta hur enkel man kan göra en cell. De absolut första cellerna på jorden bör ha varit en dekonstruerad form av de celler vi kan se idag (Uró & Lazcano 1984). Komplexiteten hos dagens celler är resultatet av de evolutions-processer som pågått under miljarder år.

För en ingenjör med målet att skapa biokemisk fabrik i miniatyr-skala så är det inte kunskapen om livets uppkomst som driver forskningen. Här handlar det snarast om att ta fram ett system som kan utföra den givna uppgiften till en så låg kostnad som möjligt. Ett sådant



Figur 3. En idé om vilka komponenter som krävs för att skapa en semi-syntetisk



cellulärt system kanske inte alls behöver se ut som de naturliga celler vi känner till idag. Så länge systemet kan upprätthålla sig själv och utföra sin uppgift är det fullgott. Oavsett vad som är ens mål så är det viktigt att vi har en klar idé om vad vi har skapat. Forskning runt syntetisk biologi har plågats en del av att det saknats klara definitioner av vad en syntetisk eller artificiell cell faktiskt är. Detta kommer från problemet med att definiera vad liv är som jag tog upp tidigare.

På senare tid har termen semi-syntetisk minimal cell (figur 3) myntats för ett system som kan uppvisa de nyckelegenskaper en levande cell har, själv-försörjning, själv-reproducering och möjlighet till evolution (Walde 2010). För den syntetiska biologin är både dessa angreppspunkter intressanta. Det är inte orimligt att anta att även de mest inbitna ingenjörer skulle dra nytta av framgångar inom kunskapen om hur de tidigaste cellerna såg ut.

### **En RNA värld**

I dagens celler finns en hel värld av protein som utför enzymatiska reaktioner. Men har det alltid varit så? Sedan Darwin la fram sin evolutionsteori så är de flesta överens om att det någon gång under livets historia har funnits en ur-cell, en protocell. Denna cell måste ha uppstått ur någonting och även ha uppfyllt de krav vi idag har på liv. Att denna cell skulle ha varit lika komplex som de celler vi kan se idag är mycket osannolikt. Denna protocell måste ha varit starkt reducerad, ner till endast de absolut nödvändigaste beståndsdelar för att upprätthålla replikation.

Med detta resonemang medföljer ju såklart även idén om att det tidigare än så måste ha existerat kemiska processer som gett upphov till de prekursorer som var nödvändiga för liv att uppstå (Oparin 1938). Det är dock svårt att spekulera i vilken kemi som låga bakom detta då de abiotiska förhållanden som rådde på jorden vid denna tid (ca 3,9 miljarder år sedan) är till stor del okända. Det har också visat sig svårt att komma fram till en gemensam teori om hur detta tidiga liv såg ut. Många menar idag att det första livet på jorden var en RNA värld (Gilbert 1986). Argumenten för detta är att vi idag känner till många enzymer, och antalet vi känner till växer med varje år, som utgörs av RNA (ribozymer) där ribosomen kanske är det tydligaste exemplet. Dessa kan utföra många katalytiska reaktioner som man tidigare trott att endast protein kunnat utföra. Dock så saknas ribozymers för transkription och DNA/RNA polymerisering. Man har dock lyckats med att *in vitro* skapa ett RNA polymeras bestående av RNA (Johnston *et al.* 2001).

Det finns även en del problem med en RNA värld. Det mest uppenbara är hur syntesen av de molekyler som utgör RNA skulle gå till. En del personer har spekulerat i att RNA världen kanske föregicks av ett system med ett kemiskt enklare genetiskt material. För mer om prebiotisk kemi och teoretiska föregångare till RNA hänvisar jag till Orgel, 2004.

### **Semi-syntetiska celler**

Oavsett vilka de ursprungliga eller nödvändiga komponenterna som krävs för att upprätthålla en cell så krävs ett hölje, en kompartmentalisering. Om detta inte skulle finnas, utan komponenterna flöt omkring fritt i lösning så skulle avstånden mellan substrat ge en oerhört låg reaktions-hastighet, samt att inkapslingen skyddar delarna i systemet från proteinaser och DN/RNaser. I de flesta försök som gjorts har liposomer använts. Liposomer återspeglar de naturliga förekommande cell-membranen och det har varit möjligt att tillverka dessa på ett enkelt sätt under lång tid (Akashi *et al.* 1996).

De liposomer som kan skapas idag har använts, framgångsrikt, till att husera olika kemiska reaktioner. Liposomer som kunde reproducera sig själva var ett startskott på denna typ av bioteknik (Bachmann *et al.* 1992). 1994 lyckades två separata grupper med att utföra

nukleinsyra-syntes inuti liposomer (Walde *et al.* 1994, Chakrabarti *et al.* 1994). Även PCR (Oberholzer *et al.* 1995) samt uttryck av mRNA har framgångsrikt utförts med liposomer som reaktionskammare (Oberholzer *et al.* 1999). Under de första försöken med att translatera mRNA så var det mRNA bestående uteslutande av uracil nukleotider. Detta förenklar förstås processen då det som krävdes var tRNA för fenylalanin, tre elongeringsfaktorer, fenylalanyl-tRNA syntetas och aminosyran fenylalanin. Arbetet med att uttrycka mRNA i en liposom har sedan utvecklats. Under 2001 presenterade Shimizu *et al.* ett system för uttryck av en ospecificerad mRNA sekvens vilka de kallar för PURE (eng. *Protein synthesis Using Recombinant Elements*). Detta system består av 106 olika metaboliter, prekursorer, RNA samt proteiner och visar på ett stort steg framåt mot skapandet av en cell kapabel att producera sina egna beståndsdelar.

Att vara självförsörjande i avseende på protein är dock inte hela bilden. För att kunna klassas som liv, och fungera under en bestående tid, måste cellen vara kapabel att reproducera sig själv. En del av detta är syntesen av de proteiner och RNA molekyler som krävs, men för att kunna dela sig måste en cell öka i volym. Detta kan endast åstadkommas genom tillväxt i cellmembranet, både av de lipider som finns där men även de proteiner som ingår i membranet. De tidigare själv-reproducerande liposomer som skapades av Bachmann *et al.* 1992 genererades genom syntes av sina beståndsdelar direkt i medium. De nya lipiderna uppkom med andra ord inte inuti liposomen utan externt. Detta är intressant ur ett prebiotiskt perspektiv, men för en cells själv-reproduktion är inte detta system acceptabelt. De fosfolipider som naturliga celler består av uppkommer genom syntes av prekursorer, på liknande sätt som alla våra fetter syntetiseras. De är alltså ett resultat av vår metabolism, och inte något som tillförs cellerna externt (Raetz 1986).

En artificiell cell måste alltså kunna utföra en liknande bedrift. För att åstadkomma detta behövs enzymer som katalyserar de reaktioner som producerar fosfolipider från prekursorer. 2009 togs ett steg i rätt riktning mot att lösa detta problem av Kuruma *et al.* då de med hjälp av PURE systemet kunde syntetisera två enzymer nödvändiga för reaktionen. Problemen de stötte på var att det var svårt att få båda enzymerna aktiva då de var verksamma vid olika pH värden. Kvarstår gör också problemet med prekursorer som inte fritt kan diffundera över membran. Eftersom fosfolipider består av stora fett-molekyler så kan dessa inte ta sig in i cellen. Vad som måste till, och vad som finns i naturliga celler, är någon form av transportproteiner så att prekursorer och andra essentiella molekyler kan tas upp från omgivningen. Även om PURE systemet har visat sin styrka i flera experiment så är det klart att det måste till mer för att få en cell som kan kallas för liv. Transportproteiner är ett exempel på detta. Men en naturlig cell är mer komplex än så. För att klara av att uttrycka ett helt genom så krävs även ett gen-reglerings maskineri, DNA replikation/reparation, RNA syntes, protein hantering m.m. Det har föreslagits att en uppsättning på 200-300 gener kan vara ett riktmärke på vad som krävs för att producera allt detta (Luisi *et al.* 2006).

Men det är nog tyvärr inte så enkelt att man endast kan tillföra dessa gener och räkna med att det skall fungera som i en naturlig cell. Generna i en organism står under kontroll av transkriptionsfaktorer, RNA och epigenetiska faktorer (Hobert 2008, Casadesús & Low 2006). Här uppstår litet av en hönan och ägget problematik. Vilka gener krävs för regulatorerna, och vilka regulatorer krävs för uttryck av generna?

### Uppstarts-cell

Vi har kommit en bit på vägen både vad det gäller att producera syntetiska genom och artificiella celler. Frågorna som var introduktionen till båda dessa fält, vilket är det minsta möjliga genomet samt vad krävs för att skapa en minimal cell och var kommer den ifrån, håller på att få ett svar.

Ser man bortom de evolutionsbiologiska frågorna och tänker ur ett bioindustri perspektiv kommer istället frågan, hur kan vi använda oss av den här tekniken?

Den dagen vi kan producera syntetiska genom samt uttrycka dessa i en uppstarts-cell så har vi möjligheten att skapa organismer *de novo*, organismer som vi kan skraddarsy att utföra vissa specifika uppgifter. Vill vi till exempel ha en cell som skapar biodiesel från solljus vore det ideala att cellen innehöll det absolut essentiella för att utföra denna uppgift, det vill säga en kärna av de komponenter för att upprätthålla en cell i en viss miljö samt de gener som krävs för att utföra den föreslagna uppgiften.

Man kan argumentera att det inte finns ett stort behov av att först reducera en cell för att sedan lägga till de delar man vill få uttryckt. En naturlig cell innehåller ju redan allt som krävs för att upprätthålla liv. Det finns inga stora problem med att lägga till de gener man vill få uttryckt i till exempel *E. coli*. Faktum är att det är precis vad som görs vid exempelvis insulinproduktion på industriell skala idag. Vad man bör tänka på här är att det är en stor kostnad för en cell att börja uttrycka extra protein. Försök har visat att om ett protein uttrycks i hög grad, något som är önskvärt vid industrin, så påverkar detta cellens tillväxthastighet substantiellt (Scott *et al.* 2010). Till och med till den grad där tillväxthastigheten är i direkt linjärt samband med mängden ”extra protein” som uttrycks i cellen. Detta leder till att det tar längre tid att starta upp en kultur vid eventuella missöden så som virus infektion.

## Etik och problem

Att skapa artificiellt liv är något som skrämmar många. Tanken att vem som helst kan skapa vad som helst är något som är okänt och även potentiellt farligt. Tänk om någon skapar en organism som kan producera toxiner från både mjältbrand och botulism. Eller kanske en helt antibiotika resistent version av gonorré? Att mer eller mindre vem som helst ges möjlighet att skapa dessa bio-vapen menar vissa är skäl nog att införa strikta restriktioner för vad man ska kunna göra. Att det ganska enkelt skulle vara möjligt är en slutsats som inte är så svår att komma till. När viruset  $\phi$ X174 syntetiserades 2003 så behöll det sina egenskaper i form av att nya virus-partiklar producerades om det syntetiska genomet elektroporerades in i *E. coli* (Smith *et al.* 2003). Man kan då tänka sig att genomet från viruset som orsakade spanska sjukan säkerligen skulle vara aktivt om det fördes in i en mänsklig cell. År 1918 så kostade detta virus 40 miljoner människor livet (Reid *et al.* 2001). Den genetiska koden i sin helhet för detta virus finns fritt tillgänglig via de stora databaserna (NCBI, EMBL).

Men bio-vapen är inte det enda som har väckt tankar om problem med syntetisk biologi. Horisontell överföring av gener emellan organismer är något som sker varje dag. Hos bakterier och arkéer är det mycket vanligt förekommande. Det finns därför en rädsla för att nya designade gener kan sprida sig till den naturliga populationen. Detta är även det resonemang som förs när det gäller mer traditionellt framställda genetiskt modifierade organismer (GMOs). Det har framkommit artiklar som har påvisat förekomsten av horisontell gen-överföring från GM växter till bakterier, men riskerna för detta bedöms av många som små (Keese 2008).

Ett annat problem är att eftersom kunskapsfältet är i sin linda så kan patent på grundläggande metoder eller komponenter leda till att forskning hindras samt att monopol skapas. I ett försök att motverka detta har ett initiativ, med inspiration från dator-mjukvara, tagits av personer på Massachusetts Institute of Technology. Idén är att bygga upp ett standardiserat arkiv dit man kan skicka in genetiska komponenter, kallade BioBricks, vilka sen är fria att använda under ett slags creative commons licens. Många BioBricks har kommit från den internationella tävlingen för studenter, iGEM, där deltagarna utmanas att bygga biologiska system från BioBricks samt att designa egna (Brown 2007).

Vissa har höjt rösten när det kommer till påståenden som skapandet av liv. Det har varit många filosofiska och religiösa tankar bakom dessa. Ur ett naturvetenskapligt perspektiv är det svårt att se detta som något hinder mot att forskningen skulle fortsätta i den riktning den har nu. Det har dock skapat debatten om vad liv verkligen är. Detta måste dock ses som något positivt. De flesta av oss har inga svårigheter att direkt avgöra om ett objekt är vid liv eller inte. Det finns visserligen vissa svåra fall, som till exempel virus, där en mer noggrann redogörelse krävs för att avgöra om detta skall klassas som liv. Men trots denna intuitiva kunskap så har vi ingen vedertagen definition. Det är helt enkelt svårt att sätta fingret på vad liv egentligen är.

## Diskussion

Potentialen hos syntetisk biologi är det få som tvivlar på, men många är också överens om att det finns en viss övertro på den här tekniken. De resultat som kommit fram under de senaste fem åren har varit bra ”bevis-av-koncept” men det har saknats verkliga tillämpningar på forskningen. Det är till exempel fortfarande mer ekonomiskt försvarbart att introducera gener till *E. coli* och uttrycka dessa där än vad det är att syntetisera hela genom för att sedan transplantera in dessa, även om det är möjligt att ett sådant genom skulle vara mer energi-effektivt i slutändan.

De stora löften som har getts av förespråkare av syntetisk biologi har varit av vi kommer att kunna tillverka ett alternativt bränsle för vår industri och transportsektor. Inom detta finns stora förhoppningar och i juli 2010 så annonserades att olje-jätten ExxonMobil och Synthetic Genomics Inc (grundat av bland annat Craig Venter) har skapat ett samarbete för att tillverka biobränsle genom alger.

När kan vi då tänkas se dessa tekniker på en större industriell skala? Det är väldigt svårt att säga om, det finns fortfarande många hinder som måste överkommas. Både vad gäller att omvandla teori och modeller till praktik, men också måste den basala kunskapen om de processer som sker inne i cellen vad gäller metabolism och genreglering förstås bättre. Den ekonomiska aspekten måste även den fortsätta i de trender som sker just nu. Kostnaden för sekvensering fortsätter att sjuka, och även kostnaden för DNA syntes måste gå ner något. Dock har det skett ett skifte till att idag så köper många labb färdiga syntetiska gener istället för att själva modifiera dem på traditionellt sätt.

Låter man fantasin löpa finns nästan inga begränsningar för vad man skulle kunna tänkas producera för typer av organismer med ett moget bio-syntetiskt system. Här är det lätt att skena iväg in i vad som snarast kanske skulle kallas science-fiction. Men mycket av den teknik och kunskap vi har idag har vid ett eller annat tillfälle benämnts som just så.

## Tack

Tack till Sara Karlsson, Noura Al-Walai och Lage Cerenius för kommentarer och diskussioner kring uppsatsen.

## Referenser

- Akashi K, Miyata H, Itoh H, Kinoshita Jr K. 1996. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophysical Journal* **71**: 3242-3250.
- Bachmann P, Luisi P, Lang J. 1992. Autocatalytic self-replicating micelles as models for prebiotic structures. *Nature* **357**: 57-59
- Bang D, Church G. 2007. Gene synthesis by circular assembly amplification. *Nature Methods* **5**: 37-39.
- Brown J. 2007. The iGEM competition: building with biology. *Synthetic Biology, IET* **1**: 3-6.
- Caruthers M. 1985. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* **230**: 281-285.
- Casadesús J, Low D. 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 830-856.
- Chakrabarti A, Breaker R, Joyce G, Deamer D. 1994. Production of RNA by polymeraseprotein encapsulated within phospholipid vesicles. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 555-559.
- Chang TMS. 1964. Semipermeable Microcapsules. *Science* **146**: 524-525.
- Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. 2007. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19428-19433.
- Crea R, Kraszewski A, Hirose T, Itakura K. 1978. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 5765-5769.
- Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, Fritchman JL, Weidman JF, Small KV, Sandusky M, Fuhrmann J, Nguyen D, Utterback TR, Saudek DM, Phillips CA, Merrick JM, Tomb J-F, Dougherty BA, Bost KF, Hu P-C, Lucier TS, Peterson SN, Smith HO, Hutchison CA, Venter JC. 1995. The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-404.
- Gibson D, Glass J, Lartigue C, Noskov V, Chuang R, Algire M, Benders G, Montague M, Ma L, Moodie M. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**: 52-56.
- Gilbert W. 1986. The RNA world. *Nature* **319**: 618.
- Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, Maruf M, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC. 2006. Essential genes of a minimal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 425-430.
- Goeddel D, Kleid D, Bolivar F, Heyneker H, Yansura D, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs A. 1979. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 106-110.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* **283**: 1476-1481.
- Gouy M, Gautier C. 1982. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research* **10**: 7055-7074.
- Gu X, Trybilo M, Ramsay S, Jensen M, Fulton R, Rosser S, Gilbert D. 2010. Engineering a novel self-powering electrochemical biosensor. *Systems and Synthetic Biology* **4**: 203-214.
- Heidelberg J, Eisen J, Nelson W, Clayton R, Gwinn M, Dodson R, Haft D, Hickey E, Peterson J, Umayam L. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.

- Hobert O. 2008. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* **319**: 1785-1786.
- Hutchison C, Peterson S, Gill S, Cline R, White O, Fraser C, Smith H, Venter CJ. 1999. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* **286**: 2165-2169.
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs A, Heyneker H, Bolivar F, Boyer H. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**: 1056-1063.
- Johnston WK, Unrau PJ, Lawrence MS, Glasner ME, Bartel DP. 2001. RNA-Catalyzed RNA Polymerization: Accurate and General RNA-Templated Primer Extension. *Science* **292**: 1319-1325.
- Keese P. 2008. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environmental Biosafety Research* **7**: 123-149.
- Kuruma Y, Stano P, Ueda T, Luisi P. 2009. A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1788**: 567-574.
- Larin Z, Mejía J. 2002. Advances in human artificial chromosome technology. *Trends in Genetics* **18**: 313-319.
- Lartigue C, Glass J, Alperovich N, Pieper R, Parmar P, Hutchison III C, Smith H, Venter CJ. 2007. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**: 632-638.
- Lorenz M, Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **58**: 563.
- de Lorenzo V. 2008. Systems biology approaches to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 579-589.
- Luisi P. 1998. About various definitions of life. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **28**: 613-622.
- Luisi P, Ferri F, Stano P. 2006. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften* **93**: 1-13.
- Monaco A, Larin Z. 1994. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends in Biotechnology* **12**: 280-286.
- Nakabachi A, Yamashita A, Toh H, Ishikawa H, Dunbar HE, Moran NA, Hattori M. 2006. The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont *Carsonella*. *Science* **314**: 267.
- Oparin AI. 1938. *The Origin of Life*. 2:a uppl. Dover Publications, New York.
- Orgel L. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Pitcher D, Saunders N, Owen R. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**: 151-156.
- Purnick PEM, Weiss R. 2009. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature Review Molecular Cell Biology* **10**: 410-422.
- Raetz C. 1986. Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis. *Annual Review of Genetics* **20**: 253-291.
- Reid A, Taubenberger J, Fanning T. 2001. The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes and Infection* **3**: 81-87.
- Scott M, Gunderson CW, Mateescu EM, Zhang Z, Hwa T. 2010. Interdependence of Cell Growth and Gene Expression: Origins and Consequences. *Science* **330**: 1099-1102.
- Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. 2001. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology* **19**: 751-755.

- Smith H, Hutchison C, Pfannkoch C, Venter CJ. 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15440-15445.
- Su S, Modrich P. 1986. Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5057-5061.
- Oberholzer T, Albrizio M, Luisi P. 1995. Polymerase chain reaction in liposomes. *Chemistry & Biology* **2**: 677-682.
- Oberholzer T, Nierhaus K, Luisi P. 1999. Protein expression in liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**: 238-241.
- Oró J, Lazcano A. 1984. A minimal living system and the origin of a protocell. *Advances in Space Research* **4**: 167-176.
- Venter JC. 2010. Multiple personal genomes await. *Nature* **464**: 676-677.
- Villalobos A, Ness J, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S. 2006. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics* **7**: 285.
- Walde P, Goto A, Monnard P, Wessicken M, Luisi P. 1994. Oparin's Reactions Revisited: Enzymic Synthesis of Poly (adenylic acid) in Micelles and Self-Reproducing Vesicles. *Journal of the American Chemical Society* **116**: 7541-7547.
- Walde P. 2010. Building artificial cells and protocell models: Experimental approaches with lipid vesicles. *BioEssays* **32**: 296-303.