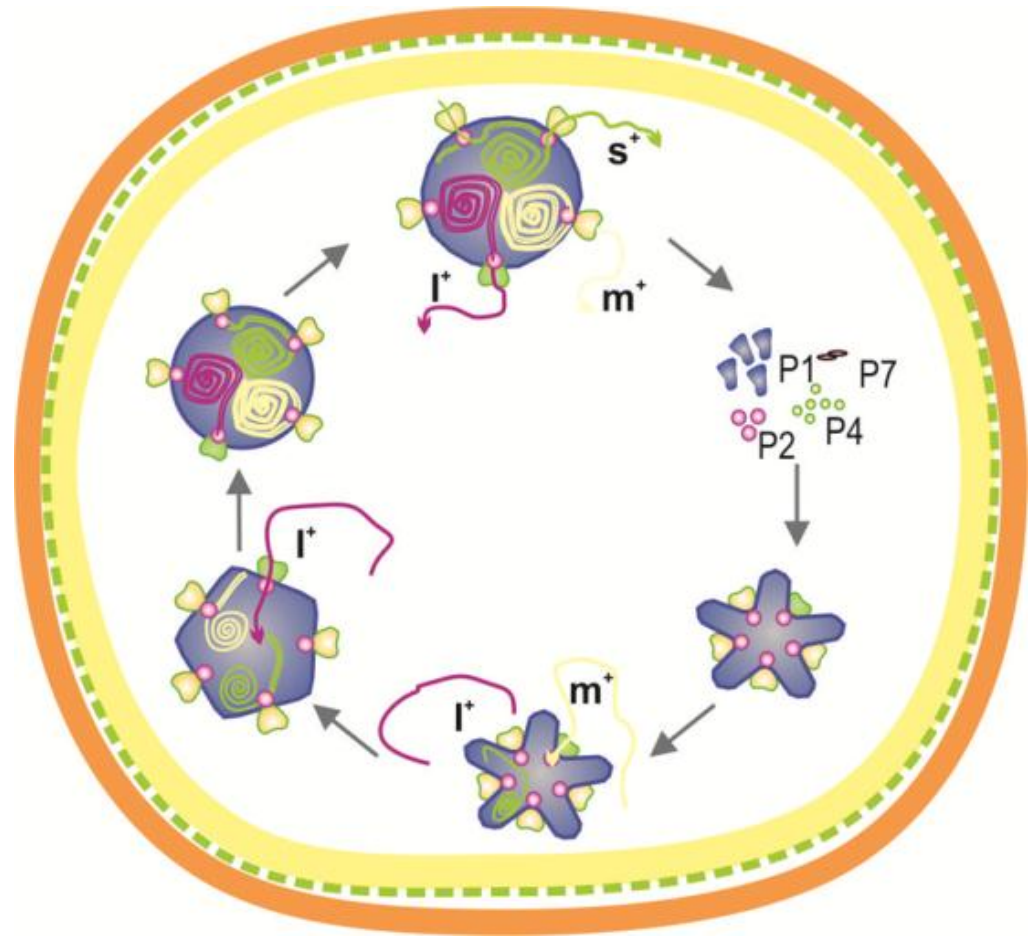


Synteettinen biologia Suomessa: Virukset synteettisen biologian työkaluina



Minna Poranen
Akatemiatutkija
Helsingin yliopisto



FinSynBio-ohjelma
Suomen Akatemia

Virukset synteettisen biologian työkaluina



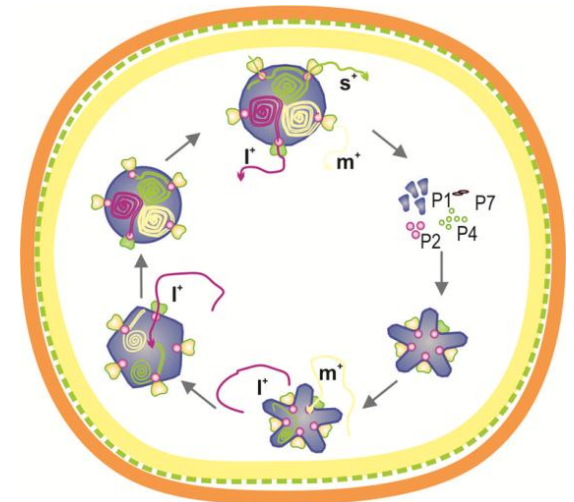
Päämääränä hyödyntää viruksissa olevia prosesseja ja rakentaa bakteerisoluja, joilla uusia viruksista peräsin olevia ominaisuuksia

Lähtökohtana virusten molekyylibiologian tarkka tuntemus

→ Kokoamisreitit ja replikaatiomekanismit tunnetaan hyvin

→ Mahdollistaa suunnitelmallisuuden ja mallinnuksen

**Tavoite: synteettinen solulinja
kaksijuosteisen RNA:n tuottamiseksi**



Miksi halutaan tuottaa kaksijuosteista RNA:ta?



- Kaksijuosteisen RNA:n (dsRNA:n) avulla voidaan käynnistää aitotumallisissa soluissa RNA-interferenssimekanismi, joka hiljentää halutun kohdegeenin ilmenemisen (RNA-hiljennys = RNA-vaimennos = RNA-häirintä).
- Käytetyn dsRNA:n sekvenssin tulee vastata hiljennettävän kohdegeenin sekvenssiä.
- Prosessin hyödyntämisellä moninaisia sovelluksia lääketieteessä; useita RNA-pohjaisia lääkkeitä kliinisissä kokeissa.
- EU:ssa kiinnostusta RNA-pohjaisten kasvivirusrokotteiden kehittämiseen.

Vallitsevat dsRNA:n tuottomenetelmät



Kemiallinen synteesi:

- Tuotetaan lyhyitä yksijuosteisia RNA-pätkiä ja hybridisoidaan dsRNA:ksi

Entsymaattinen synteesi

- Tuotetaan pitkiä dsRNA-molekyylejä DNA-templaalista entsyymaattisesti hyödyntäen virusperäisiä RNA-polymeraaseja
- Tuotetut pitkät dsRNA:t voidaan prosessoidaan pieniksi häiritseviksi RNA:ksi (siRNA) Dicer-entsyymin avulla

Tarvitaan tehokkaampia dsRNA:n tuottoprosesseja

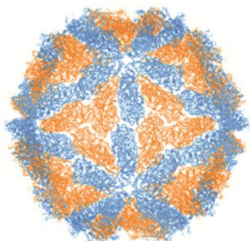
dsRNA-virukset

= virukset, joiden genomi on kaksijuosteista RNA:ta

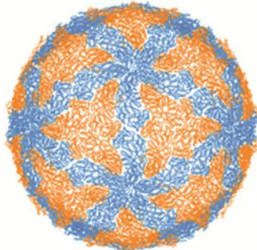


- Tuottavat infektiionsa aikana molekyylikoneen, joka monistaa dsRNA:ta
- Proteiineista muodostuva nanopartikkeli, jonka sisällä RNA-synteesi tapahtuu (läpimitta noin 50 nm)
- Virus-spesifiset RNA:t kuljetetaan rakenteiden sisään monistusta varten

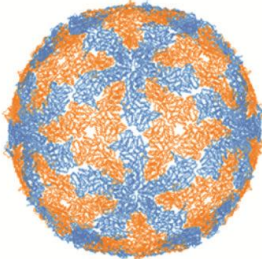
hiivan
L-A virus



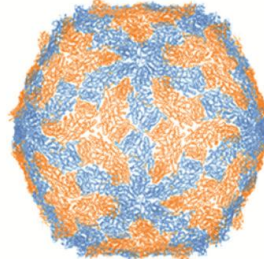
rotavirus



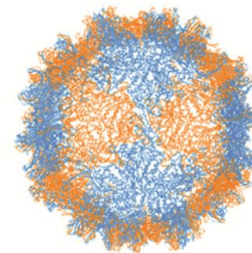
sinikieli-
tautivirus



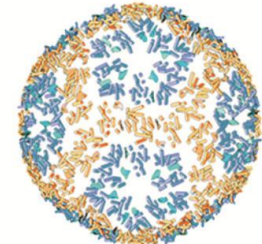
riisin
kääpiövirus



kanin pico-
birnavirus



phi6-faagi

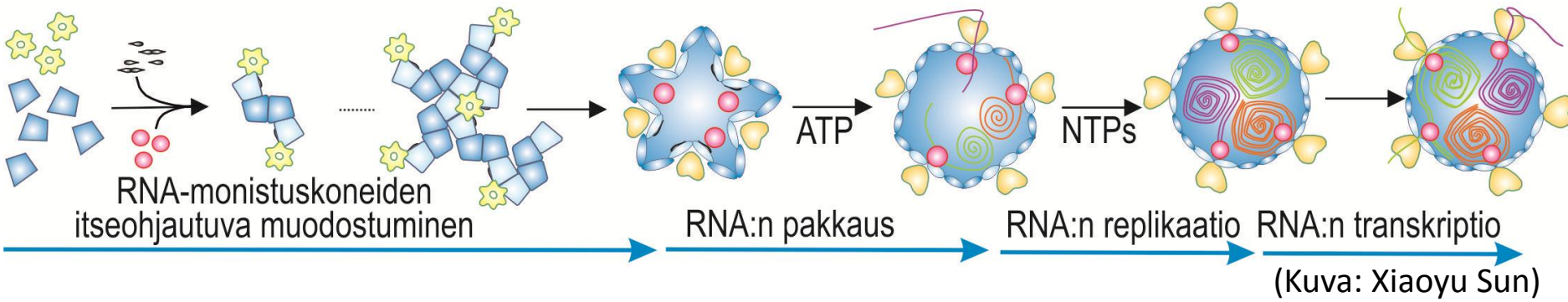


(Kuva: Luque et al 2010, Journal of Virology mukaan)



dsRNA-bakteriofagi phi6

- Parhaiten tunnettuja dsRNA-virusia
- dsRNA:n monistuksesta vastaava molekyylikone muodostuu 270 proteiinalayksiköstä; massa noin 14,6 MDa
- Voidaan rakentaa hallitusti koeputkessa puhdistetuista proteiineista
- Voidaan tutkia RNA:n monistamiseen liittyviä prosesseja tarkoin määritellyissä koeputkiolosuhteissa
- Voidaan myös viedä solun sisälle -> käynnistää phi6 infektiota.




















Mahdollista selvittää yksityiskohtaisesti molekyylisiä vuorovaikutuksia ja prosesseja, jotka johtavat virus-RNA:n monistumiseen.

-> Lähtökohta phi6-peräisten RNA-monistuskoneiden hyödyntämiselle

Synteettisten solujen rakentaminen: vaihe 1

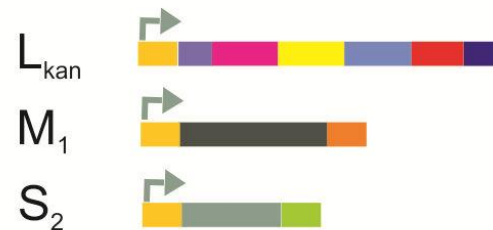
- Valitaan phi6-genomista dsRNA:n tuotolle välttämättömät alueet; valitaan kohdesekvenssit kohdegenomista
- Phi6-peräisiä geneettisiä osia yhdistellään ja liitetään yhteen kohdegenomeista valittujen sekvenssien kanssa

Geneettiset osat ja tuotteet

T7-promoottori		
T7-polymeraasi		
Selektio markkери		
		
phi6-spesifisiä kohdennussignaaleja		
		
		
phi6 geenejä		
Kohdesekvenssi 1		
Kohdesekvenssi 2		



Geneettiset rakennelmat (DNA)

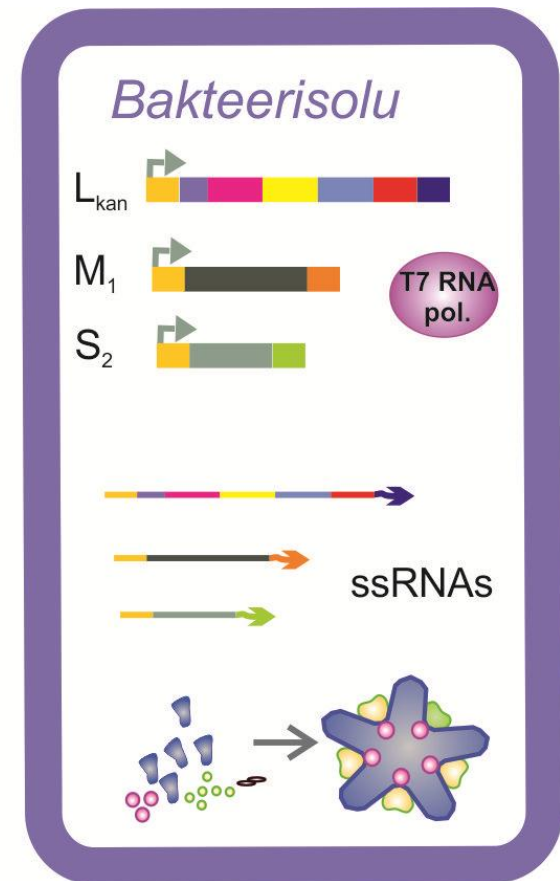
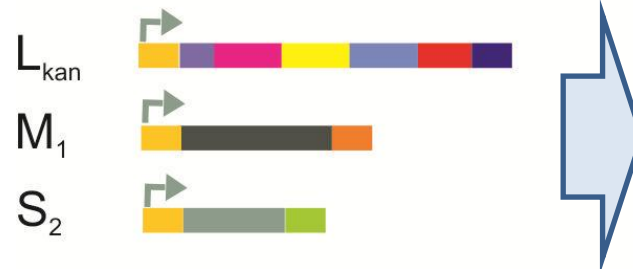


Synteettisten solujen rakentaminen: vaihe 2

Viedään geneettiset rakennelmat bakteerisoluuun, joka tuottaa bakteriofagi T7 RNA-polymeraasi

- ⇒ geneettisistä rakennelmista tuotetaan yksijuosteista RNA:ta
- ⇒ RNA:sta tuotetaan phi6-proteiineja
- ⇒ Phi6-proteiinit muodostavat spontaanisti RNA-monistuskoneita

Geneettiset rakennelmat



Lyhytaikainen välivaihe; käytetyt geneettiset rakennelmat eivät monistu.

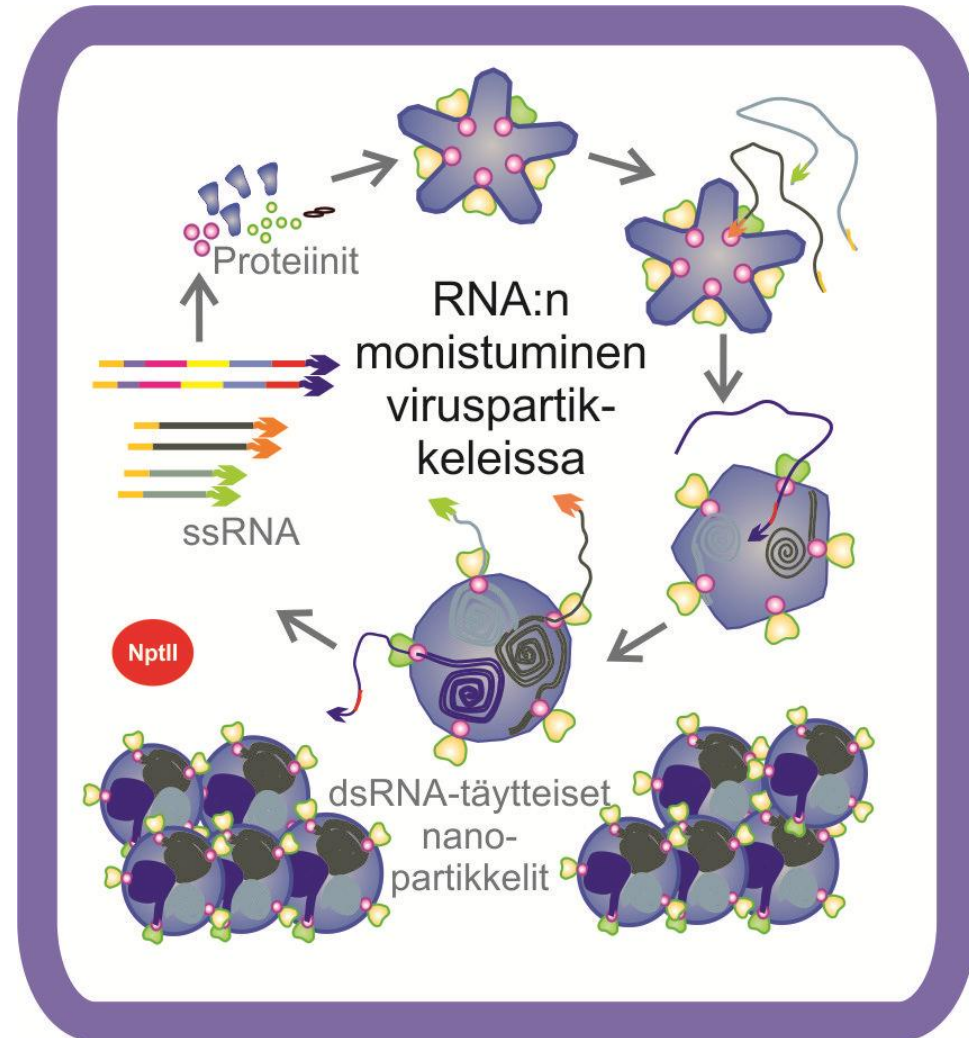
Synteettisten solujen rakentaminen: vaihe 3

Synteettinen solu, jossa monistuminen tapahtuu RNA-tasolla (ei DNA:na).

RNA-monistuskoneiden ja dsRNA:n itseohjautuva monistuminen.

RNA monistuu solun sisäisissä nanopartikkeleissa, jotka muodostuvat virusproteiineista.

Virusperäisten kohdennussignaalejen avulla voidaan ohjata halutut osat näihin rakenteisiin.



Synteettiset bakteerisolot mahdollistavat tehokkaan dsRNA-molekyylien tuoton

- Tuotettuja RNA-molekyylejä voidaan käyttää erilaisissa sovelluksissa halutun kohdegeenin hiljentämiseen
- RNA-pohjasten kasvinsuojeluaineiden toivotaan parantavan ruoantuotannon ympäristöystävällisyyttä ja ruoan laatua
- dsRNA-molekyylejä voidaan myös hyödyntää lääketieteessä kehitettäessä vaihtoehtoisia strategioita esim. virustauteja vastaan
- Synteettisten solujen kehittämisen kautta saadaan myös uutta tietoa prosesseista, jotka liittyvät dsRNA virusten itseohjautuvaan rakentumiseen ja genomien monistumiseen.

Helsingin yliopisto

Alesia Romanovskaya

Xiaoyu Sun

Gabija Žiedaitė

Outi Lyytinen

Heli Mönttinen

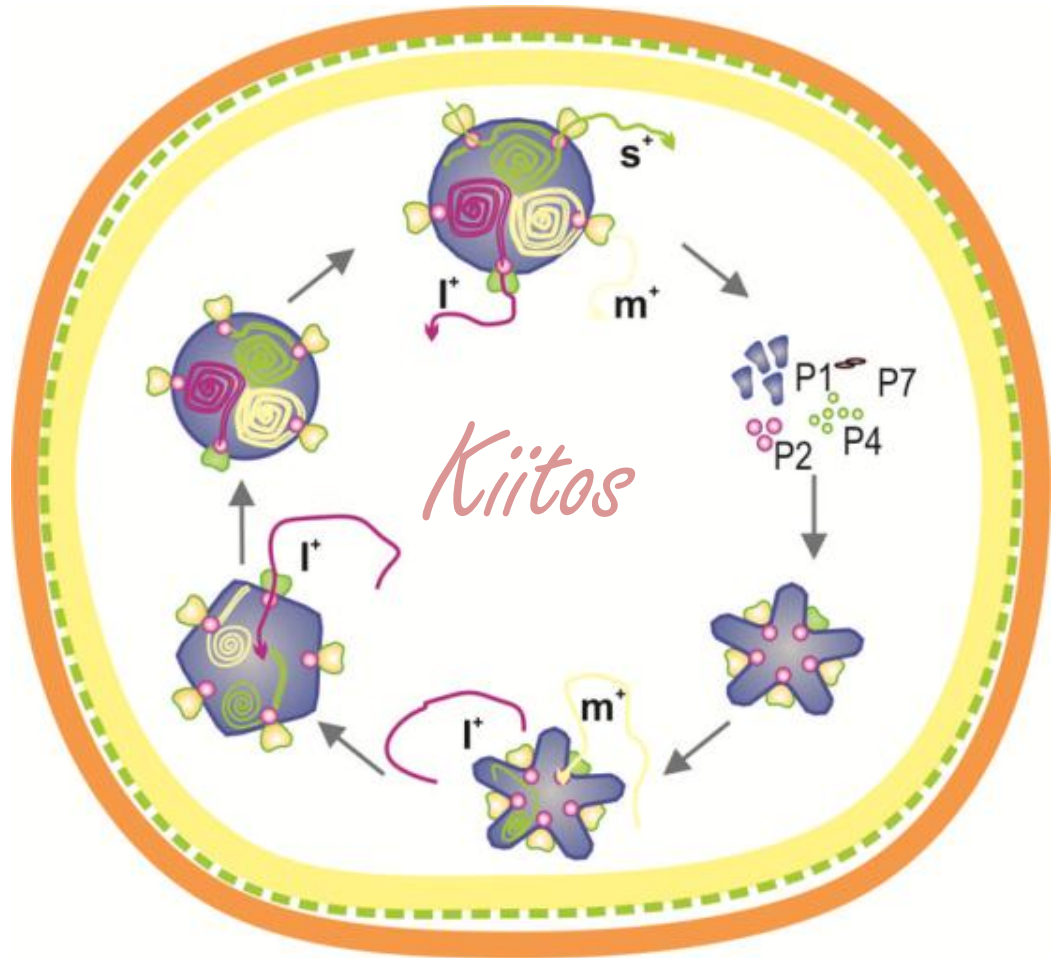
Riitta Tarkiainen

Tanja Westerholm



Annette Niehl

Manfred Heinlein



FinSynBio-ohjelma
Suomen Akatemia