

SUUNNATUN EVOLUUTION SAAVUTUKSIA

TUOMAS HUOVINEN

Evoluutioteoriasta puhuttaessa viitataan yleisimmin biologiassa vallalla olevaan käsitykseen, jolla selitetään eliölajien syntyä. Sen sijaan vähemmälle huomiolle on jäänyt, että evoluutiota on hyödynnetty myös työkaluna lukuisissa laboratorioissa jo useamman vuosikymmenen ajan. Tämän suunnatuksi evoluutioksi kutsutun laboratoriotekniikan avulla on kehitetty lukuisia ihmiskuntaa hyödyttäviä proteiinipohjaisia tuotteita, kuten teollisuusentsyymejä ja lääkeainemolekyylejä. Tässä artikkelissa avataan suunnatun evoluutiotekniikan toimintaperiaatetta, historiaa ja tähänastisia saavutuksia. Artikkelisi syventää viime vuoden Millennium-tekniologiapalkintoon liittyvää uutisointia, jolloin suunnatun evoluutiotekniikan uranuurtaja professori Frances Arnold palkittiin elämäntyöstään.

Vuoden 2016 Millennium-palkinto myönnettiin yhdysvaltalaiselle biokemistille Frances Arnoldille evoluution hyödyntämisestä proteiinien muokkaustyössä. Nykyisin tämä suunnattuna evoluutiona tunnettu tekniikka on perusmenetelmä lukuisissa yliopistolaboratorioissa ja biotekniikan alan yrityksissä ympäri maailmaa. Suunnatun evoluution ideana on matkia luonnonvalintaa lisäämällä mutaatioita esimerkiksi entsyymiä koodaavaan geeniin ja valikoida luotujen mutanttien joukosta halutun ominaisuuden suhteen parantuneita versioita. Menetelmä on samanaikaisesti sekä nerokas että aivoja säästävä, koska tutkijan ei tarvitse varsinaisesti tietää, millaisia muutoksia halutun ominaisuuden kehittäminen vaatii. Riittää kun tutkijalla on tarvittava tietotaito geenivarianttien luomiseen ja sellaisen valintakokeen pystyttämiseen, jolla halutun ominaisuuden kehittymistä voidaan mitata. Uusien proteiinien, kuten entsyymien, kehittäminen on erityisen hyödyllistä, koska niiden avulla voidaan vähentää ympäristölle haitallisten kemikaalien käyttöä lukuisilla teollisuuden aloilla. Tulevaisuudessa entsyymien muokkausta ja suunnattua evoluutiota harjoitetaan varmasti yhä laaja-alaisemmin, esimerkiksi vauhdittamaan siirtymistä energiantuotannossa fossiilista polttoaineista kohti uusiutuvia raaka-aineita.

Uusia versioita kohdeproteiinista

Suunnattua evoluutiota voi harjoittaa toki geeneihin tietoisesti koskematta – jos aikaa on. Näin ihmiskunta on tehnytkin viimeiset 10 000 vuotta ja-lostaessaan kotieläimiä ja viljelykasveja. Suotuisat geenivariantit on siirretty eteenpäin sukupolvelta toiselle autuaan tietämättöminä molekyyli-tason yksityiskohdista. Eräs seuratuimmista luonnollisen evoluution näyteikkunoista on käynnissä Michiganin yliopiston mikrobiologian ja molekyyli-genetiikan laitoksen laboratoriossa, missä professori Richard Lenski viljelee tutkimusryhmineen *Escherichia coli* -bakteereja päivästä toiseen. Koe on jatkunut yhtenäisesti jo yli 28 vuoden ja 65 000 bakteerisukupolven ajan. Kasvatuksista pakastetaan säännöllisesti näytteitä ja niistä tutkitaan, mitä muutoksia bakteerin perimään on ajan saatossa ilmestynyt. 40 000 sukupolven kohdalla tehty DNA:n sekvensointi paljasti, että bakteerin

perimään oli syntynyt 627 yhden DNA-emäksen muutosta ja 26 muuta tapahtumaa, jotka sisälsivät ylimääräisiä ja kadonneita emäspareja sekä ympärikäntyneitä DNA-jaksoja (Barrick 2009). Tällä vauhdilla laskettuna yksi DNA-muutos jonkin päin bakteerin 4,6 miljoonaa emäsparia syntyisi keskimäärin yhdeksässä päivässä. Mikäli mutaation haluaisi löytyvän juuri tutkijaa kiinnostavasta kohdegeenistä, peukaloita saa pyöritellä vielä aika paljon kauemmin, ellei ole lottovoittaja-ainesta (mutaation aikaansaaminen tyypilliseen tuhat emäsparia kattavaan geeniin on epätodennäköisempää kuin viisi oikein lotossa). Lenskin viljelykokeessa päästiin dokumentoimaan myös uusien ominaisuuksien ilmestymistä, sillä 33 000 sukupolven jälkeen havaittiin bakteereja, jotka pystyivät hapellisissa olosuhteissa hyödyntämään sitraattia (sitruunahapon anioni) energialähteenään, mitä *E. coli* -bakteerit eivät yleisesti pysty tekemään (Barrick 2009). Tästä innostavasta havainnosta huolimatta suunnattua evoluutiota voi suositella karsimättömille sieluille, koska molekyylibiologisia tekniikoita hyödyntämällä luonnollista mutaationopeutta voidaan kiihdyttää ällistytävällä tavalla. Yksittäisestä geenistä voidaan esimerkiksi erityisen PCR-tekniikan avulla luoda muutamassa tunnissa miljoonien geenien joukko, joista jokaisessa on lukuisia DNA-mutoksia.

Koejärjestelmän mieltäminen suunnatuksi evoluutioksi vaatii kahden ehdon täyttymistä: 1) tutkija lisää tietoisesti mutaatioiden määrää kohdeorganismissa tai kohdegeenissä, ja 2) tutkija suunnittelee valintakokeen, jonka perusteella halutun ominaisuuden suhteen kehittyneet yksilöt tunnistetaan ja poimitaan jatkoon. Teoriahan kumpuaa tunnetusti jo Charles Darwinilta, mutta alan soveltavana pioneerina voitaneen pitää professori Edmund Chi Chien Linin tutkimusryhmän julkaisua vuodelta 1964, jossa hyödynnettiin kemiallista mutageneesiä monimuotoisuuden luomiseksi *Aerobacter Aerogenes* -bakteerin perimään (Lerner 1964). Lin ja kumppanit seuloivat erityisten elatusalustojen avulla mutanttien joukosta bakteereja, jotka kykenivät hyödyntämään ksylytolia energialähteenään.

Suunnatun evoluution nykytekniikoiden juuret löytyvät 1990-luvun alkupuolelta, jolloin Millennium-palkittu Arnold astui estradille. Hän pystyi

PCR-tekniikkaa hyödyntäen kohdistamaan mutaatioryöpyä vain ja ainoastaan kohdegeeniin lisäten merkittävästi todennäköisyyttä parannellun version löytymiselle (Chen 1993). Toinen oivallus oli jatkaa sitkeästi geenijoukkion jatkojalostusta ottamalla edellisen valintakierroksen mutantit lähtömateriaaliksi ja maustamalla ne lisämutaatioilla. Tästä joukosta poimittiin taas halutun ominaisuuden suhteen parantuneet mutantit laboratoriokeksen avulla, minkä jälkeen koko homma toistettiin jälleen kerran. Nämä ovat edelleenkin suunnatun evoluution perusmenetelmiä, joihin on viime aikoina yhdistetty yhä voimakkaammin proteiinin rakenteen tuntemuksesta syntyneitä ideoita ja tietokoneavusteista suunnittelua.

Mitä on saatu aikaiseksi?

Klassinen esimerkki suunnatusta evoluutiosta on Arnoldin tutkimusryhmän tutkimus, jossa proteiineja pilkkovaa subtilisiini-entsyymiä muunneltiin sietämään paremmin liuottimia. Arnoldin ryhmän evoluutiokokeiden lopputuotos oli ankaria olosuhteita kestävä subtilisiini-variantti, joka pysyi 256-kertaa alkuperäistä subtilisiinia aktiivisempana 60 %:n dimetyyliformamidi-liuoksessa (Chen 1993). Subtilisiinin suuren teollisen merkityksen vuoksi entsyymistä on kehitetty vuosien saatossa lukuisia uusia versioita eri sovelluksia silmällä pitäen. Tahroja poistavia subtilisiineja on muunneltu toimimaan muun muassa alhaisemmissa lämpötiloissa, pitämään toiminnallisen rakenteensa mahdollisimman pitkään pesuainetiivisteissä ja pilkkomaan entsyymien alkuperäisestä dieetistä poikkeavia proteiinirakenteita (Cobb 2013). Geeniteknisesti parannelluista subtilisiineista olemme päässeet nauttimaan 1990-luvulta lähtien, jolloin niitä alettiin lisätä pesuaineisiin.

Mahtipontinen esimerkki vihreän teknologian edistämisestä on kuuden yrityksen yhteisponnistuksena kehittämä versio hiilihappoanhydraasista (Alvizo 2014). Ilmaston lämpenemistä voidaan hillitä entsyymeillä, kuten hiilihappoanhydraaseilla, jotka sieppaavat hiilidioksidia tehtaiden savukaasuista ja muuntavat sitä hiilihapoksi biokemiallisen reaktion avulla. Useimmat entsyymit ovat herkkärakenteisia biomolekyyliä, jotka eivät kestä äärimmäisiä olosuhteita, esimerkiksi elämää savupiipussa. Suosituin kemiallinen menetelmä hiilidioksidin poista-

miseen on absorboida se savukaasuista emäksiseen liuottimeen. Niinpä tutkimuskohteeksi valikoitui *Desulfovibrio vulgaris*-bakteerista peräisin oleva anhydraasi, joka oli jo valmiiksi aktiivinen emäksisessä metyyliidietanoliamiiniliuoksessa. Alkuperäisen entsyymien rakenne ei kuitenkaan kestänyt jatkuvaa yli 40 °C:n lämpötilaa. Systemaattisen geneettisen monimuotoistamisen ja kahdeksan suunnatun evoluutiokierroksen tuloksena eristettiin entsyymi, jossa oli 36 uutta mutaatiota. Uuden entsyymien aktiivisuuden puolittuminen vaati 14 viikon hautomista 50 °C:n lämpötilassa, kun vastaavasti alkuperäisen entsyymien aktiivisuudesta puolet katosi jo 15 minuutissa. Pilottiasemalla tehdyssä tutkimuksessa havaittiin entsyymikatalysoidun reaktion tehostavan hiilidioksidin talteenottoa jopa 25-kertaisesti aiempaan kemialliseen prosessiin verrattuna (Alvizo 2014).

Suunnattu evoluutio proteiinilääkkeiden kehityksessä

Suunnattua evoluutiota on hyödynnetty monipuolisesti myös muiden proteiinien kuin entsyymien ominaisuuksien muunteluun. Malliesimerkki sitojaproteiinin kehittämisestä on AbbVie-yrityksen valmistama biologinen reumalääke Humira, jota vuonna 2016 myytiin 16 miljardin dollarin arvosta (GEN 2017). Tieteelliseltä nimeltä Humira on monoklonaalinen vasta-aine adalimumabi, jonka vaikutus perustuu vasta-aineen kykyyn hillitä tulehdusta. Adalimumabi estää välittäjäaine tuumorinekroosifaktori-alfan (TNF α) sitoutumisen sitä tunnistavaan reseptoriin solujen pinnalla, mikä katkaisee tulehdusta edistävän viestiketjun etenemisen. Humiran kehitystyössä hiirestä eristetty TNF α :aa tunnistava vasta-aine muunnettiin ihmisen vasta-ainetta muistuttavaksi, jotta potilaan elimistö ei tunnistaisi lääkemolekyyliä vierasaineksi ja estäisi sen toimintaa. Tämä muuntotyö tehtiin 1990-luvun alkupuolella *E. coli*-bakteerin viruksiin perustuvan faaginäyttökemian ja suunnatun evoluution avulla tietämättä siis etukäteen, millainen DNA-sekvenssi lopputuotteessa tarkkaan ottaen olisi (Jespersen 1994). Myöhemmässä kehitystyössä lääkekandidaatin sitoutumisvoimakkuutta TNF α -proteiiniin paranneltiin lisämutaatioilla – edelleen faaginäyttökemian ja suunnattua evoluutiota hyödyntäen (Nixon 2014).

Faaginäyttötekniikassa virusten pinnalle ilmentään sijoitaproteiineja, jotka adalimumabin tapauksessa ovat TNF α :n tunnistamisesta vastaavia osia kokonaisesta vasta-aineesta. Viruksen pinnalla jököttävää vasta-ainetta koodaava geeni löytyy samaisen viruksen kuoren sisältä (Smith 1985). Täten kun valitaan kohteeseen sitoutuva viruspartikkeli, valitaan samalla sitoutumisen aikaansaavan proteiinin rakennusohjeet, jotka on kirjoitettu viruksen DNA:han. Myös faaginäyttötekniikassa hyödynnetään aiemmasta Arnoldin työstä tuttua toistuvaa kaavaa. Valintakokeesta selviytyvä virusjoukko monistetaan bakteereissa, virusten sisältämiin geeneihin lisätään mutaatioita ja valintakoe toistetaan uudelleen. Näin valintakierrosten ja geneettisen muuntelun avulla virukseen liittyneiden proteiinien ominaisuuksia voidaan kehittää haluttuun suuntaan. Tosin seuloessa miljardeja erilaisia vasta-ainegeenejä esitteleviä virusjoukkoja geenijoukkoon ei lisätä mutaatioita ensimmäisten valintakierrosten aikana vaan luotetaan siihen, että tavoiteltu kultahippunen löytyy jo olemassa olevien geenien koelmista.

Muita faaginäyttötekniikalla kehitettyjä vasta-aineita ovat mm. Benlysta (belimumabi), jota käytetään punahukkana (SLE) tunnetun autoimmuunisairaudesta hoitoon ja Lucentis (ranibizumabi), jota käytetään puolestaan näkökyvyn heikkeneistä aiheuttavien silmänsairauksien, kuten kostean silmänpohjan ikärappeuman (AMD), hoitoon. Biologiseksi aseeksi luokitellun pernaruton torjuntaan on myös kehitetty vasta-ainehoito, raxibakumabi (Nixon 2014). Pernaruttobakteerin myrky on vaarallista nisäkkäille ja siksi myrkyä neutralisoivan vasta-aineen kehittäminen soveltuu nimenomaan tehtäväksi faaginäyttötekniikan ja suunnatun evoluution avulla, missä nisäkkäitä ei tarvita. Tavanomaisessa vasta-aineiden tehtaissa luotetaan nimittäin nisäkkäiden luontaisen immunitetin kehittymiseen, mikä perustuu koeläimien piikittämiseen ja immuunivasteen odoteluun. Raxibakumabi on erityinen lääke myös siitä syystä, että Yhdysvaltain lääkelaitos FDA hyväksyi lääkkeen tehokkuuden testaamisen eläimissä ihmisten sijaan pernaruton vaarallisuuden vuoksi (FDA 2012).

Uusia sovelluskohteita geeniterapiassa

Tulevaisuudessa pääsemme nauttimaan suunnattujen evoluutiokokeiden hedelmistä myös muilla kuin edellä kuvatuilla biotekniikan klassikkosektoreilla, jotka tähtäsivät entsyymien ja sijoitaproteiinien ominaisuuksien paranteluun. Kun geenien editointi on tehostunut mullistavan CRISPR Cas9 -tekniikan ansiosta, geeniterapiaa kohtaan on ladata paljon uusia odotuksia niin syövän, sydän- ja verisuonitautien kuin perinnöllisten sairauksien hoidossa. Keskeinen tekijä geeniterapian onnistumisen kannalta ovat turvalliset ja tehokkaat menetelmät geenien siirtämiseen potilaan kohdekudokseen. Geeniterapiaan erikoistuneissa laboratorioissa on suunnatun evoluution avulla alettukin jatkojalostamaan geenikuljettimina toimivia virusvektoreita. Tavoitteena on muunnella virusten pintaproteiineja ja valikoida virusyksilöitä, jotka pystyvät siirtämään DNA:ta soluihin tehokkaammin ja myös tunkeutumaan uusiin, geeniterapiahoitoon kannalta keskeisiin, solutyyppeihin.

Koska geenikuljettimina yleisesti käytettävät virukset ovat luonnollista ihmisissä mylläävää alkuperää, merkittävällä osalla geenihoitoa saavista potilaista on jo valmiiksi viruksen toimintaa haittaavia vasta-aineita veressään, mikä heikentää hoidon tehoa. Niinpä Kalifornian yliopistossa on professori David Schafferin laboratoriossa kehitetty suunnatun evoluution avulla geenikuljettimena käytetystä adenoassosioidusta viruksesta versioita, jotka pystyvät paremmin väistämään potilaan ärhäkkäät vasta-aineet. Viiden löydetyn mutaation ansiosta muunnellun viruksen torjuminen vaati jopa 96-kertaa enemmän neutralisoivia vasta-aineita kuin alkuperäinen virus (Bartel 2012). Yksittäisten geenien ja virusten lisäksi kokonaisia metaboliapolkuja voidaan optimoida ja jalostaa suunnatun evoluution avulla esimerkiksi uusiutuvien energialähteiden ja lääkeaineiden tuottamiseksi. Näiden tavoitteiden saavuttaminen on tullut merkittävästi helpommaksi uusien geenitekniisten menetelmien ja genomiskensoinnin ansiosta.

Lähteet

- Alvizo O, Nguyen LJ, Saville CK ym. (2014). Directed evolution of an ultrastable carbonic anhydrase for highly efficient carbon capture from flue gas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 16436–16441.
- Barrick JE, Yu DS, Yoon SH, Jeong H, Oh TK, Schneider D, Lenski RE ja Kim JF (2009). Genome evolution and adaptation in a

- long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* 461: 1243–7.
- Bartel MA, Weinstein JR ja Schaffer DV (2012). Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery. *Gene Therapy* 19: 694–700.
- Chen K ja Arnold FH (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 5618–5622.
- Cobb RE, Chao R ja Zhao H (2013). Directed Evolution: Past, Present and Future. *AIChE Journal* 59: 1432–1440.
- Genetic Engineering and Biotechnology News (GEN) (2017). The Top 15 Best-Selling Drugs of 2016. www.genengnews.com (haettu 1.08.2017).
- Jespersen LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR (1994). Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (NY)* 12: 899–903.
- Lerner SA, Wu TT ja Lin EC (1964). Evolution of a catabolic pathway in bacteria. *Science* 146: 1313–5.
- Nixon AE, Sexton DJ ja Ladner RC (2014). Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *MAbs* 6: 73–85.
- Smith GP (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315–1317.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2012). Approval Letter – App. Number 125349Orig1s000. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/125349Orig1s000App.pdf (haettu 1.08.2017).

Kirjoittaja on toiminut post doc -tutkijana Cambridgen yliopiston biokemian laitoksella Florian Hollfelderin tutkimusryhmässä erikoisalanaan suunnatut evoluutiotekniikat. Nykyisin hän on yliopisto-opettaja Turun yliopiston biokemian laitoksella.

SUOLAN ROOLI PASTASSA

Ruoanlaittoon liittyy runsaasti myyttejä: lihan täytyy olla huoneenlämpöistä ennen paistamista ja juuri uunista taiteiltu kaku lässähtää, jos sen täryttää vahingossa pöydän kulmaan. *Hyppysellinen tiedettä. Valeomenapiirakka ja muita kokeiluja keittiössä* (Gaudeamus 2017) rohkaisee suhtautumaan kokkaamiseen uteliaasti ja testailemaan keittiössä uusia asioita. Kirjassa ruokaa rakastavat tutkijat **Anu Hopia** ja **Erik Fooladi** sukeltavat ruoanlaiton kemiaan, purkavat myyttejä ja etsivät parhaita reseptejä.

Jostakin syystä italialaisissa pastankeitto-ohjeissa suolan määrä on moninkertainen verrattuna suomalaisiin ohjeisiin. Kirjoittajat yrittivät selvittää, mistä näin suuri ero johtuu. Ensimmäinen peruste suolan lisäämiselle on maku ja toinen tärkeä peruste liittyy pastan rakenteeseen. Heidän kysymyksensä oli: ”Vaikuttaako suola keitinvedessä pastan rakenteeseen, vai onko kyseessä makuasia?” Kokeensa jälkeen kirjoittajat suosittelevat, että vähäsuolaisessa vedessä kannattaisi keittää vain du-

rumpastaa. Vähäsuolaisessa vedessä myös ylikypsymisen vaara on ilmeinen. Suola siis muokkaa pastan rakennetta.

EKOLOGISEN TUTKIMUKSEN VAIKUTUS

Ekologisen tutkimuksen yhteiskunnallinen vaikutavuus on monipuolista ja laaja-alaista, mutta aivan liian vähän tunnettua. Tämä käy ilmi Suomen Akatemian uudessa selvityksessä. Ekologinen tutkimus kytkeytyy yhteiskunnallisiin vaikutuksiinsa luonnon tuottamien ekosysteemipalveluiden kautta. Ekologit näkevät tutkimuksensa vaikuttavan vahvimmin luonnon monimuotoisuuden turvaamiseen sekä ympäristön ja luonnonvarojen kestävään käyttöön. Ekologian alan tutkijat näkevät roolinsa vahvana myös poliittisen ja hallinnollisen päätöksenteon ja sääntelyn valmistelussa.

Ekologian, evoluutiobiologian ja ekofysiologian tutkimusta vertailtiin selvityksessä kolmeen muihin tieteenalanaan: historiatieteisiin, materiaali-tieteeseen ja -teknologiaan sekä lääketieteellisen tekniikan ja terveysteknologian tutkimukseen. Vaikuttavuutta arvioitiin viidellä ulottuvuudella: vaikutuksilla ympäristöön ja luonnonvaroihin, talouteen, julkisiin palveluihin ja instituutioihin, terveyteen ja hyvinvointiin sekä kulttuuriin ja ihmisten kyvykkyyksiin.

Selvityksen havainto oli, että tutkimusalojen reitit vaikuttavuuteen poikkeavat toisistaan. Ekologian alalla reiteistä vahvimmin nousi esiin julkisuuden kautta vaikuttaminen. Yhteistyön tyypillisenä muotona ovat keskustelut tiedon käyttäjien kanssa työpajoissa ja tapaamisissa.

Selvityksessä tarkasteltiin myös erilaisten ekologian tutkimustyyppien yhteyttä tutkijoiden vaikuttavuuden kokemuksiin. Yhteiskunnallisilta vaikutuksiltaan monipuolisinta ja laaja-alaisinta on niin sanottu käytäntösuuntautunut perustutkimus, jossa perustutkimus yhdistyy käytännöllisiin päämääriin. <http://www.aka.fi/fi/akatemia/julkaisut/>