

Kolo: Krajské

Kategoria: A

Teoreticko-praktická časť

**Praktická úloha č. 2****Téma: Syntetická biológia a biomolekulárne počítače**

Otázkou, či je možné umelo vytvoriť živý systém, sa ľudia zaoberajú už pomerne dlho, avšak syntetická biológia ako odbor vznikla relatívne nedávno. Jej cieľom je nielen pochopiť, či je možná syntéza života (a ak nie, prečo), ale aj pripraviť také molekuly a organizmy, ktoré evolučne nevznikli. t. j. preskúmať možné cesty, ktoré evolúcia nevyužila.

1. Označte (+) tie z nasledujúcich možností, ktoré môžu vysvetľovať, prečo potenciálne môže existovať omnoho viac adaptácií, ktoré počas evolúcie nevznikli. Ostatné možnosti označte (-).

Niektoré adaptácie nemôžu existovať z dôvodu obmedzenia fyzikálnymi zákonmi. Napr. nie je možné zabezpečiť správne prúdenie krvi v otáčajúcej sa končatine podobnej kolesu.	
Keďže evolúcia neoptimalizuje, mnohé adaptácie, ktoré vznikli, sú síce funkčné, ale nemusia byť najlepšie možné.	
Na vznik niektorých možných adaptácií nebol vytvorený selekčný tlak.	
Keďže evolúcia modifikuje už existujúce riešenia, to, ktoré adaptácie boli realizované, závisí vo veľkej miere od štartovacích podmienok.	

Metódy syntetickej biológie nám umožňujú nielen lepšie pochopiť fungovanie organizmov prostredníctvom pokusov o ich úpravu, či znovuvytvorenie, ale umožňujú nám vytvoriť molekuly, bunky a organizmy s priemyselne či medicínsky zaujímavými vlastnosťami. Zaujímavými a dôležitými objektami záujmu syntetickej biológie sú preto biomolekulové počítače, ktorých analýze a navrhovaniu sa budete venovať v tejto úlohe (Ak sú vám niektoré pojmy nejasné, použite slovníček na konci úlohy). Počítač môžeme definovať ako zariadenie, ktoré vykonáva logické operácie so vstupnými dátami, pričom výsledkom sú určité výstupy. V tomto zmysle sú počítačmi organizmy, bunky, aj niektoré molekuly. Napríklad každá bunka neustále meria rôzne parametre vonkajšieho a vnútorného prostredia, ako sú teplota, koncentrácia nutrientov, poškodenie DNA, prítomnosť signálov od iných buniek atď. Prostredníctvom regulačnej siete mnohých génov tieto vstupy následne integruje a výstupom môže byť napr. produkcia signálnych molekúl, zastavenie alebo vstup do bunkového cyklu, presun na iné miesto a pod.

3. Napíšte ešte dva možné vstupy a dva výstupy „bunkového počítača“, ktoré nie sú uvedené v predchádzajúcom texte.

Vstupy: \_\_\_\_\_

Výstupy: \_\_\_\_\_

Ako už bolo spomenuté, za spracovanie všetkých vstupných signálov zodpovedajú génové regulačné siete, t. j. mnohé vzájomne funkčne prepojené gény, ktoré ovplyvňujú svoju aktivitu. V týchto sieťach môžeme rozoznať motívy využívajúce rovnaké logické operácie ako súčasné počítače. Napríklad, ak máme dva vstupy A a B, existuje viacero operácií (tabuľka), na základe ktorých je možné sa rozhodnúť, či vznikne výstup. Predstavme si napr., že vstupmi sú rastové faktory, oba potrebné na to, aby sa bunka začala deliť (výstup). Takáto regulácia môže byť dosiahnutá prostredníctvom genetického okruhu, ktorý vykonáva operáciu A AND B.

vstupy		výstupy (pri konkrétnej operácii)					
A	B	AND	NAND	OR	NOR	XOR	XNOR
-	-	-	+	-	+	-	+
+	-	-	+	+	-	+	-
-	+	-	+	+	-	+	-
+	+	+	-	+	-	-	+

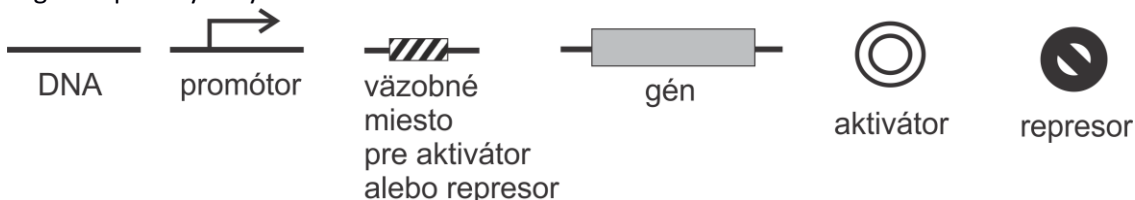
4. Ku každému z nasledujúcich popisov doplňte do tabuľky, ktorú z horeuvedených logických operácií predstavuje. Viaceré možnosti môžu obsahovať rovnakú logickú operáciu.

Zvliekanie hlístovca <i>C. elegans</i> je riadené dvoma transkripčnými faktormi, ktoré sú redundantné, t. j. ak je jeden z nich mutovaný, zvliekanie prebieha normálne. Zvliekanie sa zastaví, iba ak sú nefunkčné oba faktory.	
Enzymatická reakcia, katalyzovaná enzýmom D-alanín-(R)-laktát ligázou prebehne iba vtedy, ak sú prítomné oba substráty, tj. D-alanín a R-laktát.	
Červené farbivo v lupeňoch hrachu vzniká z bezfarebného prekurzora dvoma enzymatickými reakciami. Ak je jeden z enzýmov neprítomný alebo poškodený, lupene budú biele.	

5. Nasledujúce obrázky ilustrujú zjednodušené schémy logických okruhov založených na regulácii transkripcie. V týchto schémach (ak nie je v konkrétnom prípade uvedené inak) platí, že:

- Vstupné molekuly A a B sú transkripčné faktory, ktoré aktivujú transkripciu daného génu
- Aby bol gén exprimovaný, musí byť v jeho promótoře naviazaný aspoň jeden transkripčný aktivátor (výnimka v príklade 2).
- Výstupom je expresia génu C.
- Ak je v promótoře daného génu naviazaný represor, nebude aktívny, aj keby bol v tom istom promótoře naviazaný aktivátor.
- Transkripčné faktory sú zobrazené pri miestach, na ktoré sa viažu.

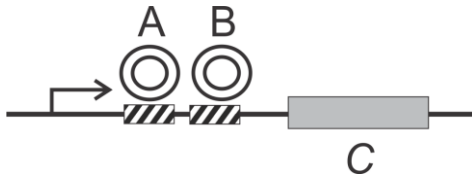
Legenda použitých symbolov:



Pre každý z uvedených príkladov doplňte tabuľku, či bude gén C exprimovaný v závislosti na prítomnosti faktorov A resp. B a rozhodnite, ktorú logickú operáciu daný príklad predstavuje.

**Príklad 1**

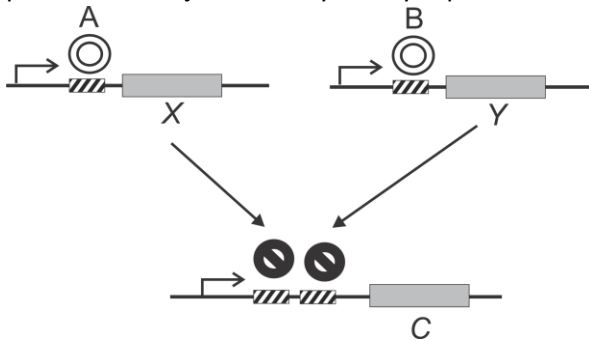
Gén C má vo svojom promotóre väzbové miesta pre proteíny A a B, ktoré sú aktivátormi.



A	B	expresia C
-	-	
+	-	
-	+	
+	+	
operácia:		

**Príklad 2**

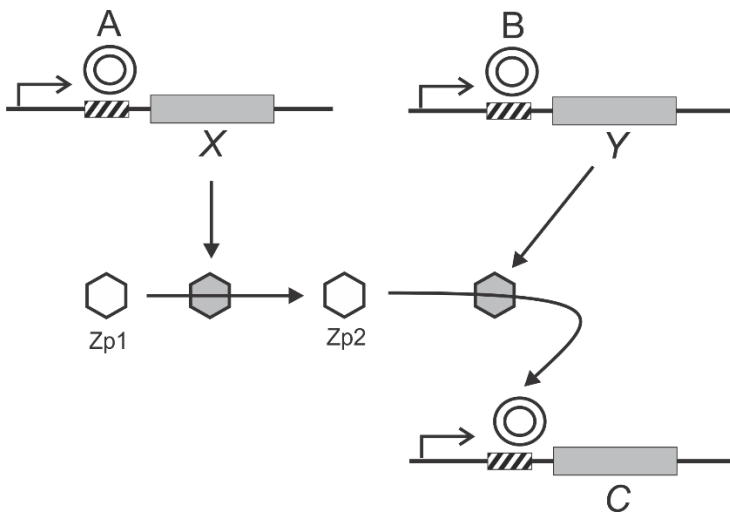
Proteíny A a B kontrolujú expresiu génov X a Y. Tieto kódujú proteíny, ktoré sú represormi génu C. Gén C je exprimovaný vždy, ak v jeho promotóre nie je naviazaný žiadny represor.



A	B	expresia C
-	-	
+	-	
-	+	
+	+	
operácia:		

**Príklad 3**

Proteíny A a B kontrolujú expresiu génov X a Y. Tieto kódujú proteíny, ktoré sú potrebné pri zmene neaktívnych prekurzorov Zp na proteín Z, ktorý je aktivátorom génu C.



A	B	expresia C
-	-	
+	-	
-	+	
+	+	
operácia:		

Keďže mnohé choroby, ako napr. rakovina, sa vyznačujú zmenenou aktivitou niektorých génov (čiže prítomnosťou alebo neprítomnosťou príslušných proteínov), jednou z možných stratégií ich liečby je využitie molekulárnych počítačov. Dnes vieme pripraviť nové molekuly DNA so želanými vlastnosťami (t. j. napr. nové logické okruhy, ktoré upravujú správanie bunky) a doručiť ich do buniek prostredníctvom vírusov. Stačí teda, ak nájdeme vhodné kandidátne proteíny, ktoré rakovinovú bunku odlišujú od všetkých ostatných buniek v danom tkanive a následne navrhujeme logický okruh tak, aby v prípade ich spoločného výskytu v cieľovej bunke spustil expresiu toxického génu a bunku zabil.

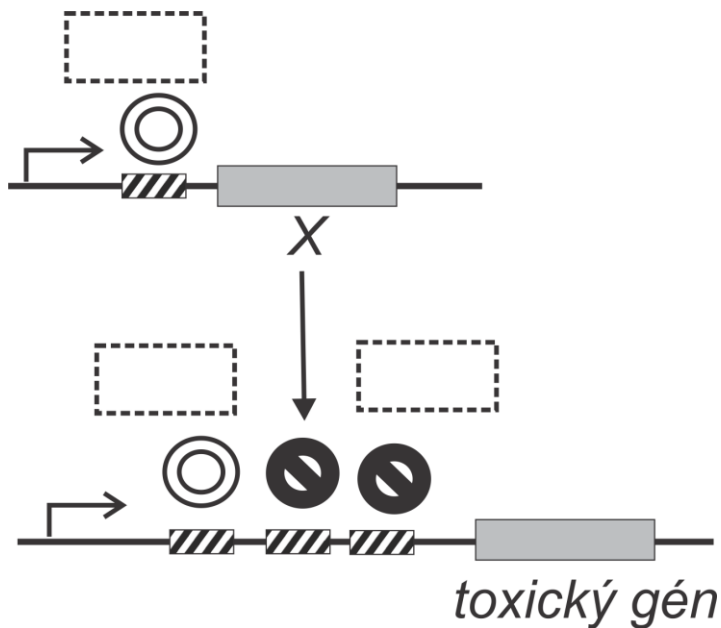
6. Predstavte si, že ste v bunkách karcinómu čriev identifikovali tri gény (EntA1, EntA2 a EntR1) so zmenenou expresiou oproti enterocytom. EntA1 a EntA2 sú aktivátory transkripcie, EntR1 je represor. V tabuľke nižšie vidíte dáta o expresii rôznych génov v týchto dvoch populáciách buniek, z ktorých ste vychádzali.

gén	enterocyty	bunky karcinómu
EntA1	+	-
EntA2	-	+
CTNNB	+	+
EntR1	+	-
GAPDH	+	+
CADHN	-	-

Ako by mal fungovať molekulárny počítač, ktorý v prípade, že sa dostane do oboch typov buniek, zneškodní iba bunky karcinómu? Doplňte tabuľku:

EntA1	EntA2	EntR1	Expresia toxického génu
+	+	+	
+	+	-	
+	-	+	
-	+	+	
+	-	-	
-	-	+	
-	+	-	
-	-	-	

7. Napokon ste sa rozhodli pre nasledujúce zostavenie logického okruhu (obrázok). Pred toxickým génom, ktorý má bunku zabiť, sú umiestnené tri väzobné miesta. Jedno z nich patrí aktivátoru transkripcie a ďalšie dve represorom. Na jedno z represorových miest sa viaže represor X, pričom gén, ktorý ho kóduje je pod kontrolou aktivátora. Doplňte do čiarkovaných políčok názvy proteínov EntA1, EntA2 a EntR1, tak aby výsledný okruh vykonával požadovanú funkciu, t. j. expresiu toxického génu v rakovinových bunkách, ale nie v enterocytoch. Pre schému platia pravidlá uvedené v úlohe 5.



8. Keď ste však svoj konštrukt pomocou vírusov dopravili do čriev myši s nádormi, ukázalo sa, že efektívne zabíja nielen nádorové bunky, ale aj Panethove bunky, ktoré sú dôležitými regulátormi črevného mikrobiómu a obnovy črevného epitelu. Neskôr ste zistili, že Panethove bunky majú rovnakú expresiu génov EntA1, EntA2 a EntR1 ako karcinóm. Ktoré z nasledujúcich možností predstavujú potenciálne riešenia tohto problému? Správne odpovede označte (+), ostatné (-).

Zabezpečiť špecifickú dopravu vírusových častíc iba do buniek nádoru.	
Upraviť vírusové častice tak, aby neboli schopné napadnúť Panethove bunky.	
Podávať myšiam aj klasické chemoterapeutiká spolu so syntetickými vírusmi.	
Nájsť ďalšie markery, ktoré odlišujú nádorové bunky od enterocytov aj Panethových buniek a upraviť dizajn logického okruhu tak, aby mohli byť jeho vstupmi.	
Vymeniť toxický gén za gén kódujúci fluorescenčný proteín.	

9. Fungovanie buniek aj syntetických molekulárnych počítačov je skutočnosťou, samozrejme, zložitejšie. Vyberte a označte (+) tie možnosti v nasledujúcej tabuľke, ktoré predstavujú potenciálne problémy pri dizajne syntetických molekulárnych počítačov. Ostatné možnosti označte (-).

Ak sú v syntetickom okruhu použité gény z iného organizmu, ako je zamýšľaný hosťiteľ, nemusia nimi kódované proteíny správne fungovať.	
Na použité regulačné oblasti sa môžu viazať aj ďalšie regulačné proteíny, čo môže ovplyvniť fungovanie logického okruhu.	
Expresia génov, použitých v logickom okruhu môže byť cieľovou bunkou regulovaná aj na úrovni RNA alebo proteínu, čo ovplyvní jeho fungovanie.	
Bunky (napr. nádorové) sa často od iných odlišujú nielen tým, či je v nich daný gén exprimovaný, ale aj mierou jeho expresie. Niekedy je teda potrebné navrhnuť logický okruh tak, aby sa správval rôzne pri rôznych koncentráciách vstupných molekúl.	

## Slovníček pojmov

Nasledujúce vysvetlenia vám môžu pomôcť ak si nie ste istí významom niektorých pojmov použitých v úlohe. Pre účely tejto úlohy sú niektoré definície zjednodušené a neuvažujeme o špeciálnych prípadoch.

- **Gén** je úsek DNA, ktorý kóduje informáciu pre vznik RNA a proteínu. Proces, pri ktorom z génu vzniká príslušná mRNA a proteín označujeme ako **expresia génu**.
- mRNA vzniká z génu pri **transkripcii** pomocou enzýmu RNA polymerázy. Tento enzým rozoznáva, špecifické sekvencie pred génmi známe ako **promótor**, na ktoré sa viaže.
- Naviazanie RNA polymerázy na promótor však samé o sebe nestačí na spustenie transkripcie. Na promótor musí byť prítomné aj ďalšie proteíny, tzv. **transkripčné faktory**.
- Nie všetky transkripčné faktory však pomáhajú pri spustení transkripcie (**aktivátory**), niektoré jej môžu naopak zabraňovať (**represory**). Transkripcia určitého génu je zvyčajne riadená prítomnosťou/neprítomnosťou viacerých transkripčných faktorov a k jej spusteniu dôjde iba vtedy, ak sa na promótor nachádza ich vhodná kombinácia. Tento jav voláme **kombinačná regulácia** génovej expresie.
- Transkripčné faktory sú tiež proteíny, sú teda kódované inými génmi. To umožňuje vytvárať vzájomné prepojenia v regulácii génov a vznik **génových regulačných sietí**.
- O tom, či sa transkripčný faktor bude viazať na svoje **väzobné miesto** (sekvenciu DNA, ktorú rozpoznáva), často rozhoduje nielen jeho fyzická prítomnosť v bunke ale aj ďalšie faktory, napr. prítomnosť pomocných proteínov, signálnych molekúl, teplota atď. To umožňuje bunke reagovať aj na signály prostredia a patrične upravovať reguláciu génov.
- Expresia génov je regulovaná nielen **transkripčne**, ale aj na ďalších úrovniach. Napr. už transkribovaná mRNA, môže byť degradovaná (**posttranskripčná regulácia**), nemusí byť z nej vyrobený proteín (**translačná regulácia**). Alebo už hotový proteín môže byť neskôr degradovaný, či chemicky modifikovaný tak, že sa zmení jeho funkcia (**posttranslačná regulácia**).

Autor: Mgr. Jaroslav Ferenc

Recenzia: doc. Mgr. Miroslava Slaninová, PhD.