

Realizace platformy pro systematické ladění negativních autoregulačních transkripčních sítí

Pavel Zach¹, Daniel Georgiev²

1 Úvod

V současné době se stále více projevuje trend využívání geneticky modifikovaných organismů v průmyslové produkci chemikálií a léčiv, v medicíně, i v mnoha jiných oborech. Výhody použití jsou nesporné - používané organismy (bakterie, kvasinky) jsou sami o sobě malými chemickými továrnami, které zvládají syntézu chemických sloučenin velmi rychle a efektivně. Přeprogramováním těchto organismů (což je často vložení člověkem vytvořených systémů dovnitř buňky) dojde ke změně chování dané buňky, která pak začne vytvářet námi požadované sloučeniny či vykazovat jiné požadované chování.

Tyto člověkem vytvořené systémy jsou nejčastěji ve formě plasmidu, nesoucího genetickou informaci. Obsažená genetická informace je pak daným "programem", podle kterého se buňka řídí.

2 Použití negativní autoregulační transkripční sítě (NAR)

Při pohledu na tyto programy jako na kybernetické systémy můžeme využít poznatků z teorie řízení k tvorbě efektivnějšího kódu.

Jak bylo ukázáno, záporná zpětná vazba slouží v transkripčních sítích ke zrychlení reakce systému [Rosenfeld et al. (2002)] a také zvyšuje robustnost celé sítě vůči působícím poruchám (fluktuační teploty, pH.), tudíž výsledné počty vytvořených proteinů (produkty našeho programu) vykazují menší varianci.

Toto jsou vlastnosti, které od našeho programu požadujeme. Samotné použití NAR nám však nemusí stačit, často požadujeme co nejvíce předvídatelný počet vytvořených proteinů při přítomnosti působících poruch. K tomu je potřeba NAR adekvátně naladit.

3 Platforma pro systematické ladění

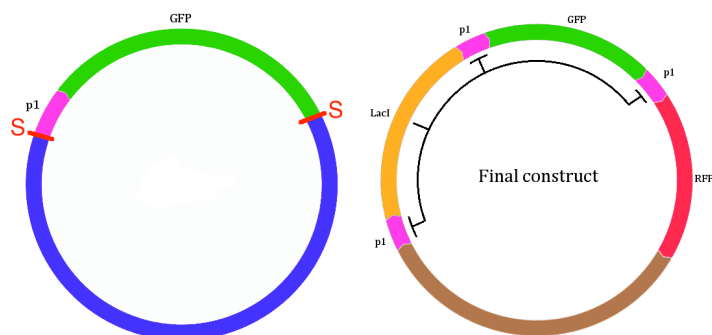
Pro námi již dříve navržený algoritmus efektivního ladění bylo potřeba vytvořit experimentální platformu. Tato platforma musela samozřejmě obsahovat NAR k ladění, a také musela poskytovat jednoduchý způsob určení výsledné koncentrace vytvořených proteinů. Důraz byl také kladen na co nejmenší časovou a experimentální náročnost ladění.

Byl tedy navržen a realizován systém tří genů (Obrázek 1) - *LacI* (negativní regulátor produkce jak vlastní, tak i ostatních dvou genů), *GFP* (zelený fluorescenční protein) a *RFP* (červený fluorescenční protein).

Použití fluorescenčních proteinů umožňuje jednoduché nepřímé určení jejich koncent-

¹ student navazujícího studijního programu Aplikované vědy a informatika, obor Kybernetika a řídicí technika, e-mail: pzach@kky.zcu.cz

² MSc. Daniel Georgiev, PhD., Katedra Kybernetiky, Západočeská univerzita v Plzni, Univerzitní 8, 306 14 Plzeň, Česká republika, e-mail: georgiev@kky.zcu.cz



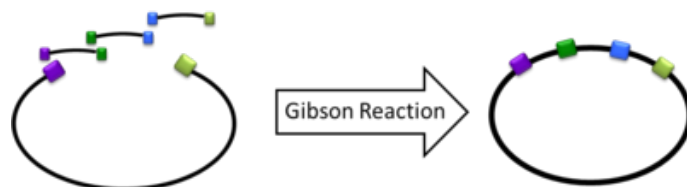
Obrázek 1: Vlevo: Jeden z dílčích plasmidů. Restriční místa (označena S) umožňují snadné vyjmutí vnitřní části pro použití ve finálním konstrukt.

Vpravo: Výsledná platforma pro systematické ladění. Je vidět inhibice částí *p1*, které jsou zodpovědné za míru produkce proteinů z daných přilehlých genů. Použité geny byly získány od sdružení BioBricks Foundation (<http://biobricks.org/>).

race pomocí měření hladiny fluorescence, která je přeprogramovanými buňkami emitována.

4 Výsledná realizace

Námi vybrané geny bylo zapotřebí vzájemně pospojovat a tím vytvořit finální plasmid. Jako techniku pro toto spojení byla vybrána poměrně nová metoda, tzv. *Gibson assembly* [Gibson, Daniel G., et al. (2009)]. Její princip spočívá v tom, že se na konce dvou sousedních genů metodou PCR přidají identické sekvence. Geny s identickými okrajovými sekvencemi se poté v jedné reakci vzájemně pospojují (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Schéma vytvoření finálního plasmidu pomocí Gibson assembly.

Zdroj: Team Washington, iGEM 2011 (<http://2011.igem.org/Team:Washington/>)

Ladění je však možné realizovat pouze na plasmidu s jedním genem, proto byly předtím vytvořeny tři dílčí plasmidy, obsahující dané geny s požadovanými přesahy. Na okrajích těchto genů jsou tzv. restriční místa, umožňující jejich snadné vyjmutí před vložením do plasmidu finálního. Toto řešení velmi snižuje experimentální náročnost, jelikož takto dané díly již mají požadované identické sekvence na svých okrajích. Po naladění jsou tak díly přímo vyjmuty a použity na sestavení finálního konstrukt, kde mohou být jejich parametry snadno otestovány.

Literatura

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nature methods* 6.5 (2009): 343-345.

Rosenfeld, N., Elowitz, M. B. a Alon U, 2002. Negative Autoregulation Speeds the Response Times of Transcription Networks. *Journal of Molecular Biology*.