

Syntetisk biologi og modeller af biologiske systemer med SBOL

Syntetisk biologi er en gren af biologien, hvor man arbejder innovativt og ingeniørmæssigt med at udvikle biologiske systemer, typisk i form af celler, som man udføre bestemte funktioner.

Eksempler kan være:

- Biosensorer, dvs. celledammer, som kan påvise tilstedeværelsen af bestemte stoffer, fx giftstoffer
- Bakteriestammer, som kan nedbryde miljøskadelige forbindelser, og hvor man kan kontrollere deres nye funktion
- Produktionsorganismer, som kan producere bestemte stoffer som de ikke ville ellers producere
- Celfrie systemer, som indeholder komponenter, enzymer ol. fra celler, som kan udføre en bestemt funktion
- Helt nye syntetiske organismer, som ikke findes i naturen.

Udviklingen af nye organismer sker gennem en innovativ proces, hvor man både arbejder tørt (med teoretiske modeller for løsningen) og vådt (med at konstruere og teste løsningen i laboratoriet).

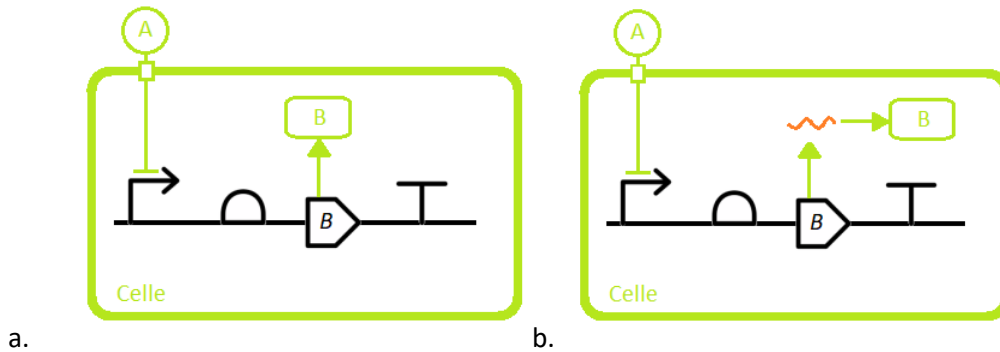
Indhold

Syntetisk biologi og modeller af biologiske systemer med SBOL.....	1
SBOL og modeller af biologiske systemer	2
Opgave 1. Læs SBOL	5
Opgave 2. Tegn gen-modeller i SBOL: <i>Lac</i> -operon	5
Opgave 3. Gen-regulering i SBOL: <i>Lac</i> -operon	6
Opgave 4. Genregulering i SBOL: Biosensor Case 2-plasmidet (Biotech Academy).....	7
Opgave 5. Genregulering i SBOL: pGLO-plasmidet (Edvotek)	8
Opgave 6. Gen-regulering i SBOL: pGLO-plasmidet (Biorad).....	9

SBOL og modeller af biologiske systemer

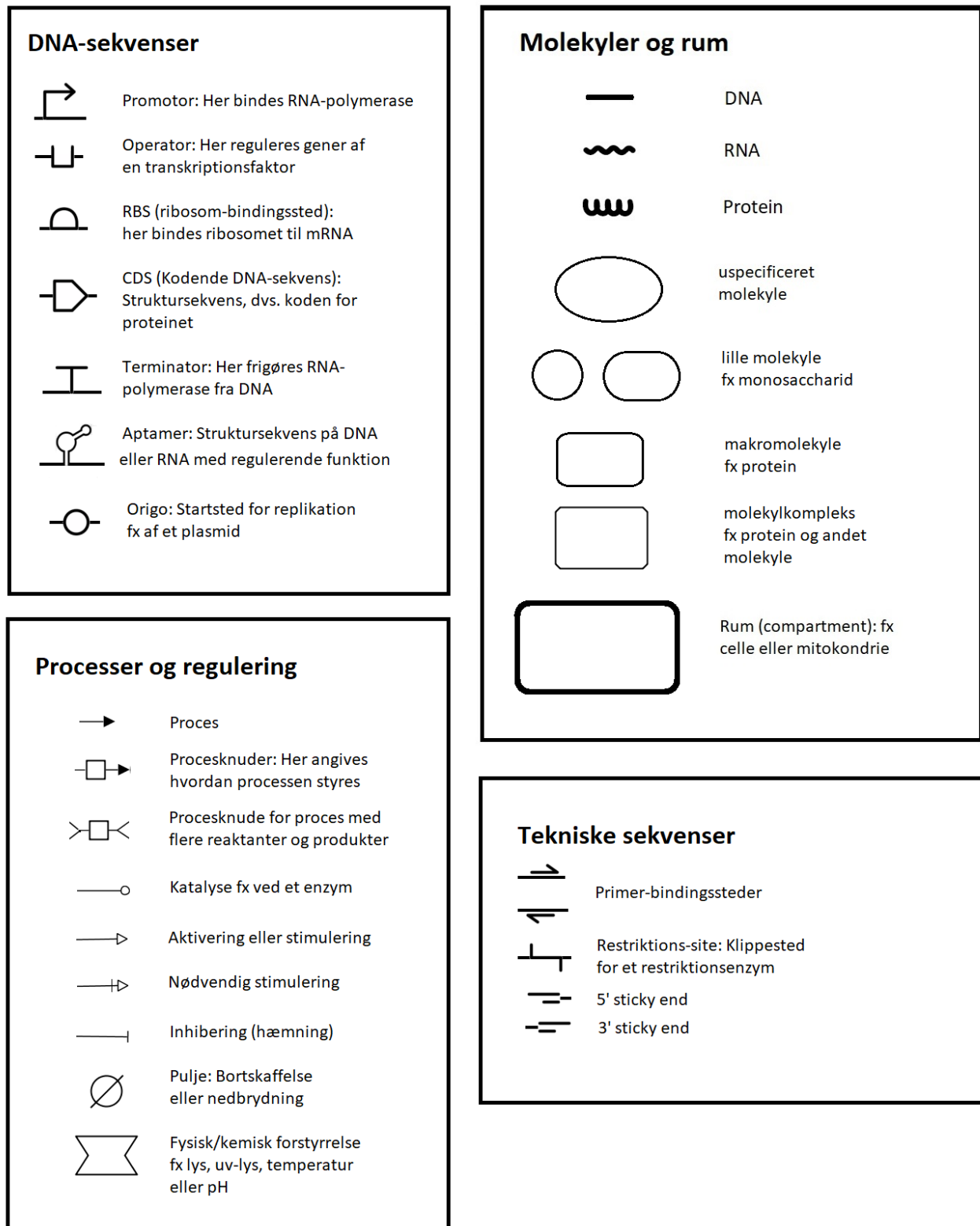
Når man udarbejder de teoretiske modeller kan man anvende det visuelle sprog Synthetic Biology Open Language, SBOL til at beskrive et systems genetiske design. Når man beskriver hvordan gener reguleres, supplerer man ofte med symboler, 'glyphs' fra et tilsvarende sprog, Systems Biology Graphic Notation, SBGN. Det gør vi også her.

Figur 1 viser et biologisk system tegnet i SBOL.



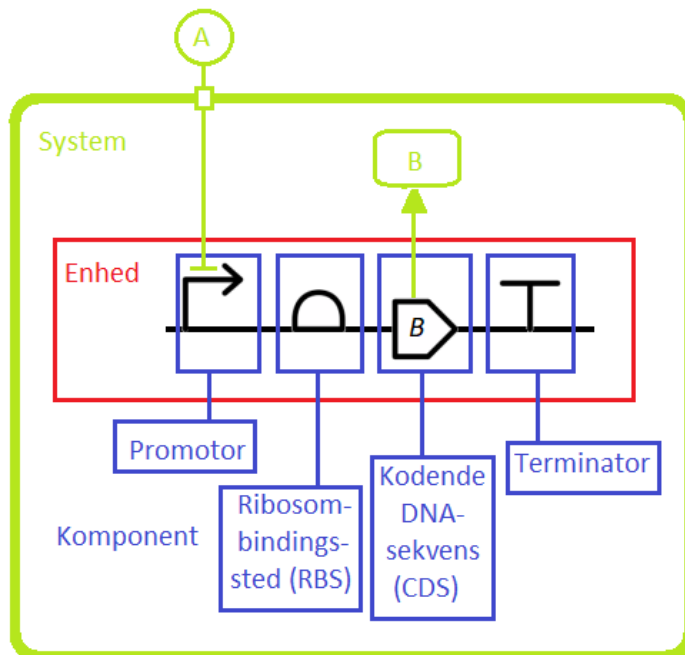
Figur 1. Biologisk system tegnet i SBOL. Genet B danner proteinet B. Hvis stoffet A optages af cellen, hæmmes syntesen af proteinet B, og produktionen af B stopper. Systemet virker altså som en kontakt for genet B, som kan slukkes og tændes vha. stoffet A. Man kan uddybe detaljer. I figur b er det fx tegnet med, hvordan genet transkriberes til mRNA (orange), som translateres til proteinet B, hvis stoffet A ikke er tilstede.

I figur 2 ses symboler, kaldet glyphs, som anvendes i SBOL. På nettet findes der programmer/editorer i SBOL, men man kan også skitsere med SBOL i hånden eller ved at kopiere dem over i et tegneprogram. Forskellige elementer i systemet kan angives med forskellige farver.



Figur 2. Glyphs som anvendes i SBOL, suppleret med glyphs fra SBGN

Et biologisk system består, om vist i figur 3 af enheder (engelsk: devices), der virker sammen og har en funktion i forhold til systemet. Enhederne er igen opbygget af komponenter (engelsk: parts).



Figur 3. System, enhed og komponent

Et gen består grundlæggende af komponenterne vist i figur 3:

- Promotor: Genets styresekvens, hvor RNA-polymerase bindes, åbner DNA-strengen og begynder transkriptionen til RNA. Promotorer kan være:
 - Konstitutive – dvs. at de altid er aktive
 - Inducible – dvs. at deres aktivitet kan reguleres op eller ned af transkriptionsfaktorer. Transkriptionsfaktorerer proteiner, som bindes til operatorsekvenser ved promotoren. Nogle transkriptionsfaktorer aktiverer promotoren andre inhiberer (hæmmer) promotoren.
 - "Utætte" (engelsk: leaky) – dvs. at de er inducible, men også laver lidt protein, selvom de er slukkede.
- RBS (ribosombindingssted): Den sekvens på mRNA, hvor ribosomerne bindes.
- CDS (Coding DNA Sequence): Den DNA-sekvens, som koder for et bestemt protein. CDS starter med en startkode, hvorfra ribosomet begynder translationen til aminosyrer, og slutter med en stopsekvens, hvor transkriptionen stopper.
- Terminator: Den DNA-sekvens, hvor RNA-polymerase frigøres fra DNA, og transkriptionen stopper.

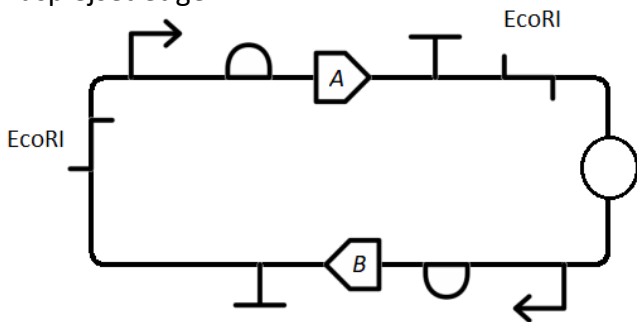
De biologiske komponenter er kodede i DNA. Dvs. at de består af en DNA-sekvens. Derfor kan de også splejses sammen i en ønsket rækkefølge.

Der udvikles for øjeblikket mange nye standard-komponenter, som kan findes i databaser. At de er standard-komponenter vil sige, at der på hver side af komponenten er bestemte restriktions-sekvenser, dvs. klippesteder for bestemte restriktionsenzymer, som gør at de kan klippes ud og kombineres indbyrdes og splejses sammen i forskellige rækkefølger. En meget almindelig offentlig tilgængelig standard for standardkomponenter kaldes biobricks, og de kan findes ved søgning på nettet.

Opgave 1. Læs SBOL

Når man ændrer i cellers genetiske design kalder man det at transformere cellen. Når man tilføjer dem nye gener skal man bruge en vektor, dvs. et system som kan overføre og udtrykke de nye gener i cellen.

I bakterier anvendes normalt vektorer, dvs. små ringformede DNA-molekyler, som kan indeholde et mindre antal gener og som kan kopiere sig i cellen. *Figur 4* viser et plasmid, hvori der er indsplejset et gen.



Figur 4. Plasmid.

1. Forklar hvilke komponenter og enheder, som findes i plasmidet ved hjælp af *figur 2*.
2. Forklar, hvad de evt. kan anvendes til i forbindelse med genspejning.

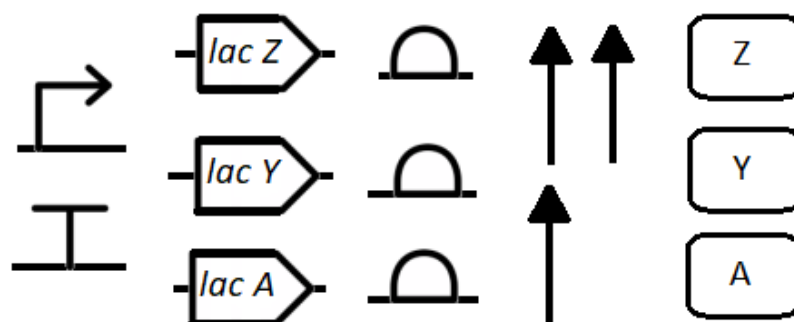
Opgave 2. Tegn gen-modeller i SBOL: *Lac*-operon

Et operon er et gen, hvor én promotor styrer transkriptionen af kodende sekvenser (CDS'er) for flere proteiner. De transkriberes altså samtidig. Operons forekommer hos bakterier.

Lac-operon gør colibakterier i stand til at optage og nedbryde lactose, dvs. mælkesukker. Dvs. at bakterier med dette operon kan udnytte lactose som en energikilde.

- *Lac*-operon indeholder tre kodende sekvenser, CDS'er: *lacZ*, *lacY* og *lacA*.
- De koder for tre forskellige proteiner, Z, Y og A. Z er det lactosespaltende enzym, lactase, Y er en lactosetransportør i cellemembranen. A har en regulerende funktion i cellen.
- Transkriptionen til RNA i et operon styres af én promotor, så der dannes ét mRNA.
- Ribosomerne bindes dog til mRNA tre steder, så hver kodende sekvens transkriberes til hvert sit protein.
- Translationen bevirker derfor, at der dannes tre proteiner ud fra samme mRNA.

1. Tegn ud fra ovenstående oplysninger en skitse af *Lac*-operon. Du skal kombinere følgende komponenter i din model:

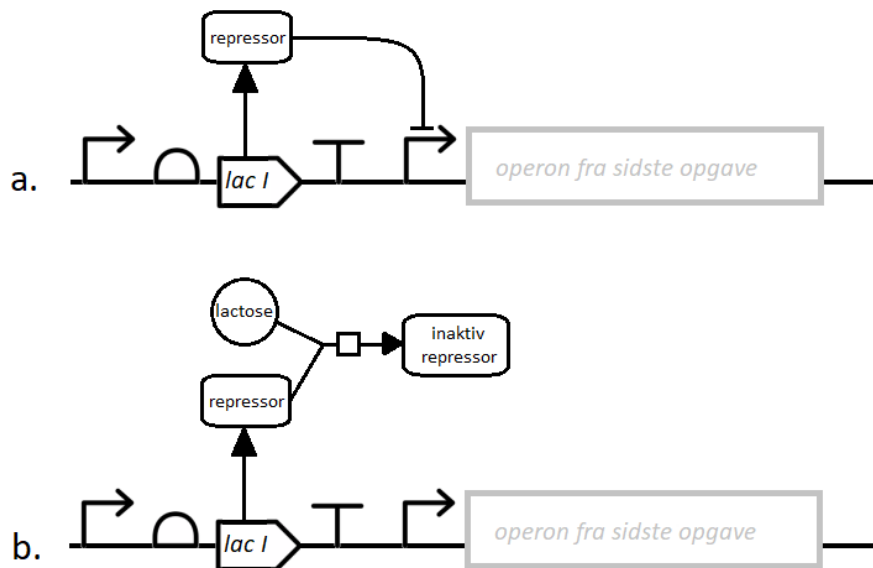


Opgave 3. Gen-regulering i SBOL: *Lac*-operon

Lac-operon'et skal aktiveres, når cellen registrerer lactose, og slukke igen, når der ikke er lactose tilstede.

- *Lac*-operons promotor reguleres af lactose og af et regulatorgen, *LacI*. Figur 5 viser reguleringen.
- *LacI* er genet for et repressor-protein, dvs. et protein, som inhiberer (dvs. hæmmer eller undertrykker) et andet gens promotor.
- Repressorproteinet kan binde lactose, hvis dette er tilstede. Sker det, kan repressorproteinet ikke bindes til promotoren.

LacI virker dermed som en kontakt for *Lac*-operon, som kan tændes og slukkes med lactose.



Figur 5. Reguleringen af *Lac*-operon. a. viser situationen, når der ikke er lactose tilstede, og operon ikke transkriberes. B. viser situationen, hvor der er lactose tilstede, og operon er aktivt.

1. Forklar ud fra figur 5, hvordan tilstedeværelse af lactose kan aktivere *Lac*-operon.
2. Forklar hvorfor det er vigtigt for cellen, at *Lac*-operon kan reguleres, så det tænder, men netop kun tænder, når der er lactose tilstede, og slukker igen, når der ikke er lactose tilstede.
Hvorfor vil bakterier med en effektiv regulering vinde i konkurrencen med bakterier, som ikke har en effektiv regulering?

Lac-operon anvendes ofte i syntetisk biologi, fordi det let kan slukkes og tændes. Man splejser så andre proteinkodende sekvenser ind i stedet for *lacZ*, *lacY* og *LacA*.

I stedet for at tænde og slukke med lactose anvender man ofte stoffet IPTG, som kan bindes til repressoren med samme virkning som lactose.

Opgave 4. Genregulering i SBOL: Biosensor Case 2-plasmidet (Biotech Academy)

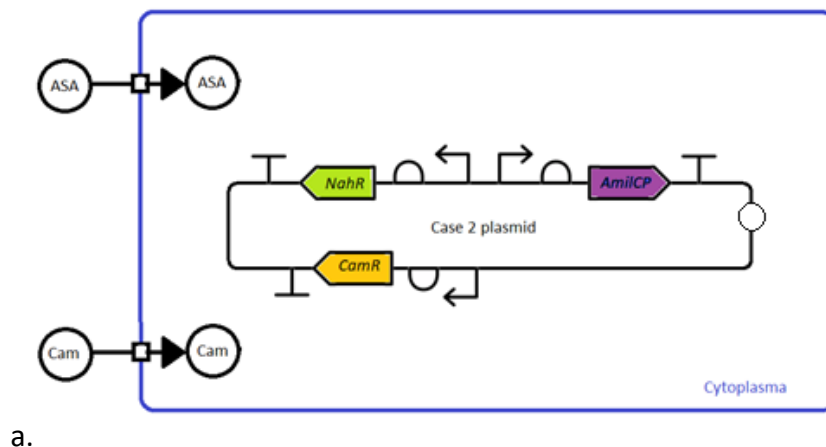
Et af de gentek-forsøg, som er godkendt til brug i gymnasiet er Biosensor Case 2 fra Biotech Academy. I forsøget transformeres celler af *E. coli* med Case 2-plasmidet, som kan påvise, om der er det smertestillende middel Acetylsalicyl-syre (ASA) tilstede. Systemet er vist i *figur 6*:

- NahR dannes fra genet *NahR*. Genet *NahR* har en konstitutiv promotor, dvs. en promotor, som altid er tændt.
- NahR inhiberer promotoren til *AmilCP*-genet
- Acetylsalicylsyre aktiverer indirekte et gen på plasmidet, *AmilCP*, som danner et lille farveprotein, AmilCP. Det gør det ved at ASA bindes til proteinet NahR, som jo ellers inhiberer promotoren til *AmilCP*-genet.

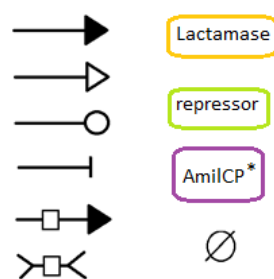
Plasmidet indeholder også et selektionsgen, dvs. et gen, som anvendes til at selektere de celler, som har optaget plasmidet.

- Chloramphenicol er et antibiotikum.
- Selektionsgenet *CamR* danner enzymet beta-lactamase, som kan spalte Chloramphenicol (Cam).

Tilsætter man Chloramphenicol til det substrat man dyrker bakterierne på, vil kun de bakterier, som har optaget plasmidet kunne overleve.



a.



b.

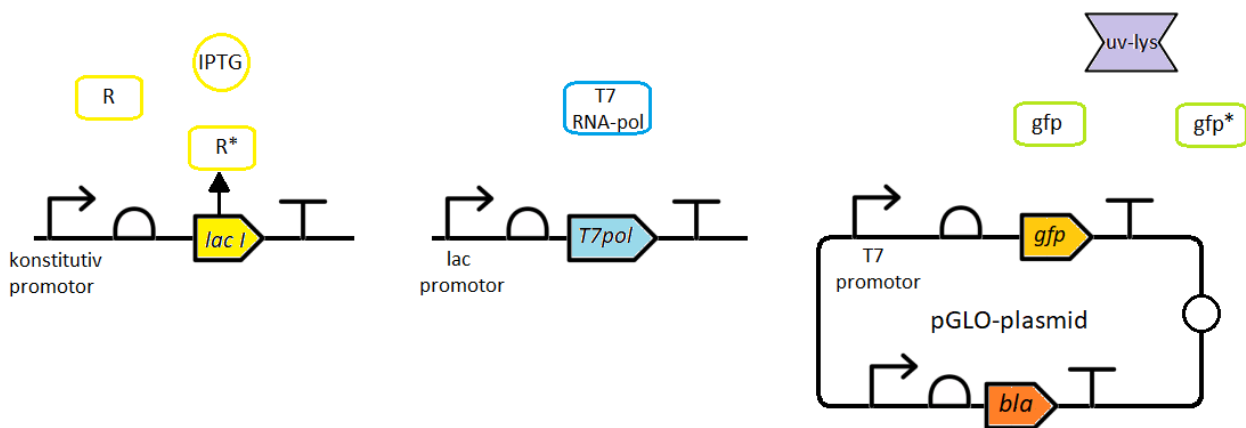
Figur 6. a. Biosensor 2-plasmidet skitseret i SBOL. b. Glyphs som anvendes til at beskrive systemet. Nogle glyphs skal anvendes flere gange.

1. Skitser ved hjælp af symbolerne i *figur 6b*, hvad der sker i cellen, fra Acetylsalicylsyre (ASA) optages i cellen og til at den lyser lilla. Du skal anvende oplysningerne i starten af opgaven, angivet med bullits. Kopier evt. *figur 6a* ind i et tegneprogram og skitser det der. Du kan finde inspiration i opgaven om Lac-operon.
2. Skitser, hvad der sker, når Chloramphenicol optages i cellen, og hvorfor det kan føre til, at celler med plasmidet kan overleve Chloramphenicol.

Opgave 5. Genregulering i SBOL: pGFP-plasmidet (Edvotek)

pGFP-plasmidet anvendes i flere af de gentek-forsøg, som er godkendte til gymnasiet. I pGFP-plasmidet findes genet *gfp*, som producerer Grønt Fluorescerende Protein, *gfp*. Når *gfp* belyses med uv-lys udsender det fluorescerende grønt lys. Figur 7 viser de enheder og komponenter, som indgår i systemet. Genet *gfp* kan aktiveres indirekte af stoffet IPTG. Det sker ved hjælp af de to kontrolgener *lac I* og *T7pol*. Det forstås bedst, hvis man først ser på selve genet *gfp*.

- *Gfp*-genet indeholder en særlig promotor, T7, hvortil en særlig T7 RNA-polymerase (T7 RNA-pol) kan bindes og starte transkriptionen.
- T7 RNA-polymerase produceres af genet *T7 pol*, som er splejset ind i bakteriens kromosom.
- *T7 pol*-genet indeholder en *lac*-promotor, som kan inhiberes af en repressor R*
- R* produceres af genet *lac I*. *Lac I*-genet vil på den måde normalt holde *T7pol* og dermed *gfp* slukket.
- Hvis stoffet IPTG er tilstede, vil det dog bindes til repressoren R*, og forhindre dets binding til *lac*-promotoren. Den inaktive repressor benævnes: R.



Figur 7. Enheder og komponenter i pGLO og reguleringen af *gfp*-genet i kit fra Edvotek.

1. Skitser ud fra beskrivelsen ovenfor, hvordan man ved hjælp af IPTG kan tænde og slukke for det grønne fluorescerende lys i en bakterie, som har optaget plasmidet pGLO. Anvend procespile og reguleringspile fra SBOL-oversigten og tegn dem ind i figur 7. Anvend glyphs fra figur 2.

I pGLO-plasmidet findes også et selektionsgen, *bla*, vist nederst i plasmidet i figur 7. Det koder for et enzym, beta-lactamase, som kan spalte antibiotikaet Ampicillin. Dvs. at celler, som har optaget plasmidet ved transformationsprocessen er resistente overfor Ampicillin og overlever på petriskåle med et substrat tilsat Ampicillin.

2. Skitser i SBOL hvad der sker, når en celle med pGLO-plasmidet optager Ampicillin og forklar, hvorfor det ikke skader cellen.

Opgave 6. Gen-regulering i SBOL: pGLO-plasmidet (Biorad)

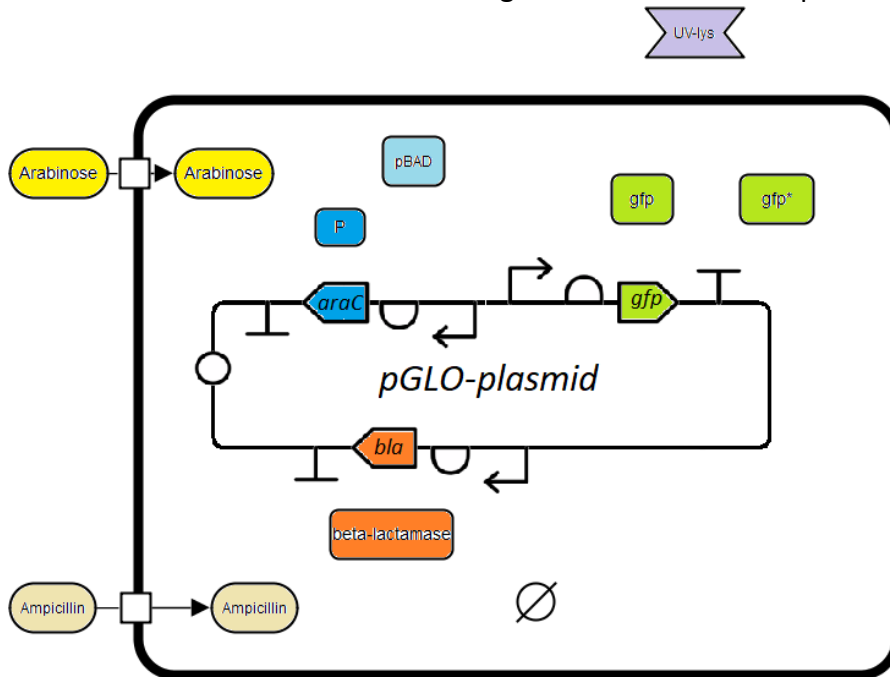
pGLO-plasmidet anvendes i flere af de gentek-forsøg, som er godkendte til gymnasiet. I pGLO-systemet i kits fra Biorad styres *gfp*-genet af en promotor, som reguleres af genet *araC*. Figur 8 viser de enheder og komponenter, som indgår i systemet.

I pGLO-plasmidet findes markørgenet *gfp*, som producerer Grønt Fluorescerende Protein, *gfp*. Når *gfp* belyses med uv-lys udsender det fluorescerende grønt lys.

AraC styres af en konstitutiv promotor og producerer derfor konstant et protein P.

Hvis P bindes til monosaccharidet arabinose, dannes komplekset pBAD, som kan aktivere promotoren for *gfp*.

Med arabinose kan man derfor tænde og slukke for bakteriens produktion af *gfp*.



Figur 8. Enheder og komponenter i pGLO fra Biorad.

1. Skitser ud fra beskrivelsen ovenfor, hvordan man ved hjælp af arabinose kan tænde og slukke for det grønne fluorescerende lys i en bakterie, som har optaget plasmidet pGLO. Anvend procespile og reguleringspile fra SBOL-oversigten og tegn dem ind i figur 8.

Ud over generne *gfp* og *araC* indeholder plasmidet selektionsgenet *bla*, hvorfra enzymet beta-lactamase produceres. Beta-lactamase kan spalte antibiotikaet Ampicillin. Det betyder at bakterier, som har optaget plasmidet kan vokse på agarplader, hvor substratet er tilsat Ampicillin. De bakterier, som ikke har optaget plasmidet, vil derimod dø.

2. Skitser i SBOL hvad der sker, når en celle med pGLO-plasmidet optager Ampicillin. Du skal anvende en procespil og en katalysepil.