



# Genmodifiera med lego

## –en övning i syntetisk biologi

Syntetisk biologi kan beskrivas som en kombination av naturvetenskap och ingenjörskonst. Med syntetiskt producerade DNA-sekvenser kan man modifiera organismer så att de får nya egenskaper.

Syntetisk biologi jämförs med ingenjörskonsten eftersom man använder sig av syntetiskt producerade och standardiserade DNA-sekvenser som enkelt kan beställas och kombineras utifrån de egenskaper forskarna önskar lägga till eller förändra i en cell eller organism. Dessa DNA-sekvenser kallas för ”bio bricks” eller ”bioklossar”. Förhoppningen är att i framtiden kunna använda metoden för att på ett mer standardiserat och effektivt sätt tillverka exempelvis läkemedel, nya material, miljövänliga bränslen eller förbättra matproduktionen. Med syntetisk biologi kan t.o.m. hela arvsmassan bytas ut och ersättas med konstruerade kromosomer, och därigenom skulle helt nya biologiska system kunna skapas.

Alla organismer, oavsett om det är prokaryoter eller eukaryoter måste reglera när och hur mycket av ett protein som ska uttryckas, detta kallas för genreglering. Processerna skiljer sig åt mellan prokaryoter och eukaryoter. Hos prokaryoter sker genreglering främst genom operoner, där flera gener som styrs av en och samma promotor uttrycks tillsammans. Regleringen sker ofta snabbt som svar på förändringar i omgivningen, till exempel genom transkriptionsfaktorer (repressorer eller aktivatorer) påverkar transkriptionens start. Hos eukaryoter beror genregleringen på flera faktorer; hur hårt kromatinet är packat, epigenetiska modifieringar (t. ex. DNA-metylering) och närvaro av transkriptionsfaktorer. Flera steg i genregleringen kan dessutom finjustera genuttrycket, t. ex. genom splitsningen av mRNA eller genom mikroRNA (miRNA) som kan blockera och bryta ner mRNA som bildats. Därigenom påverkas mängden protein som bildas.

Eftersom eukaryoter har en mer komplex genreglering är det inte alltid lätt att uttrycka eukaryota gener korrekt till funktionella protein med bioklossar och syntetisk biologi. En del eukaryota gener kan man dock uttrycka i bakterier för att få funktionella proteiner.

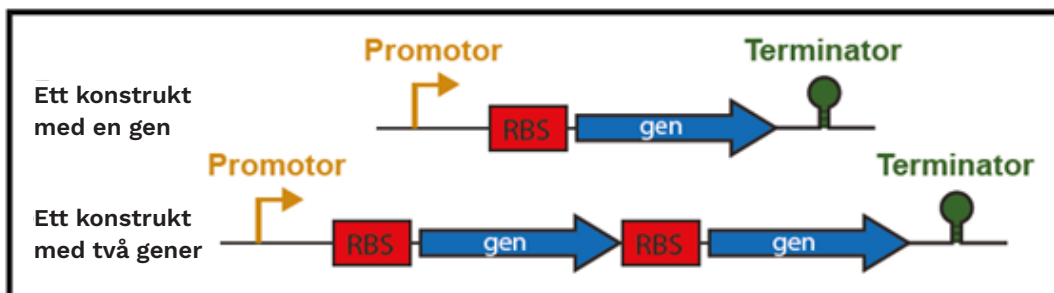
## Syfte

Ni kommer använda er av legobitar som motsvarar olika bioklossar för att konstruera DNA-sekvenser utifrån hur genuttrycket fungerar i prokaryota celler för att få en bättre förståelse för hur gener är uppbyggda och hur proteinsyntesen kan påverkas av yttre signaler.

## Så här ska ni bygga DNA-sekvenserna

De DNA-sekvenser som konstrueras och förs in i nya celler kallas för *konstrukt*. Ni ska utgå från hur genreglering och proteinsyntesen fungerar i prokaryoter när ni skapar era konstrukt. Detta är en förenkling i övningen eftersom genreglering är mer komplicerad i eukaryota celler och det är svårare att skapa proteiner i eukaryoter med syntetisk biologi. För att ett konstrukt ska kunna fungera och ett protein uttryckas i en cell, behöver följande bioklossar ingå:

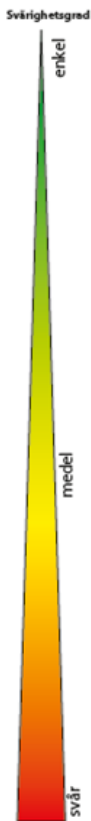
- en *gen*, proteinkodande sekvens.
- en *promotor*, som är den plats RNA-polymeraset binder till tillsammans med transkriptionsfaktorer för att transkriptionen ska starta. I syntetisk biologi kan en promotor väljas efter vilka yttre förutsättningar som ska inducera transkriptionen. Det kan till exempel vara en pH-förändring eller en skillnad i ljus-tillgång.
- en *RBS = Ribosomal Binding Site*, som är en sekvens som behövs för att ribosomen ska kunna binda och påbörja translationen av det bildande mRNA:t i prokaryoter. Både promotorn och RBS ligger före den genkodande sekvensen. Även om ni bygger ett konstrukt till en eukaryot organism ska ni ta med en RBS i denna övning.
- en *terminator*, som är en DNA-sekvens som avslutar transkriptionen i prokaryoter, denna ligger efter om den proteinkodande sekvensen. Även om ni bygger ett konstrukt för till en eukaryot organism ska ni ta med en terminator i denna övning.



Så här ska ni bygga era konstrukt. Om två proteiner ska produceras samtidigt kan ett operon byggas med en promotor som styr båda gener.

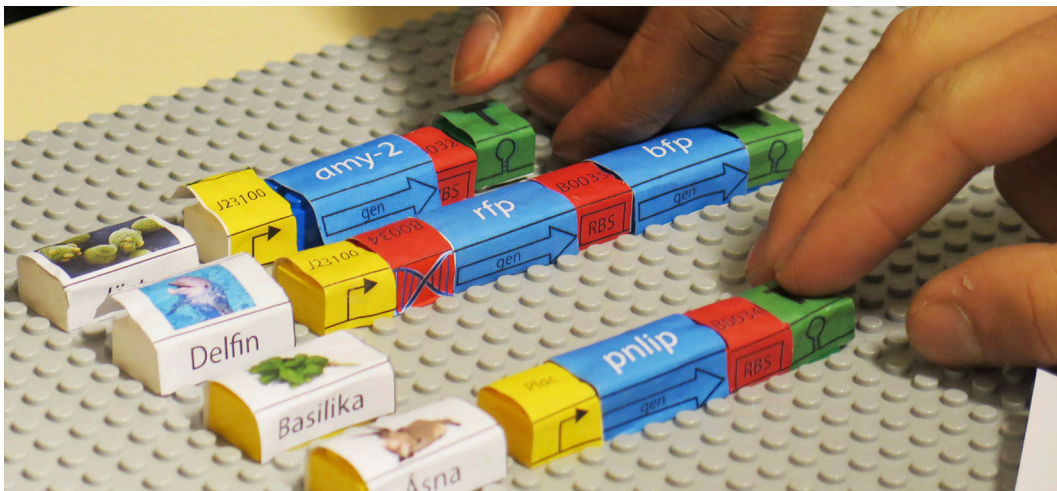
## Tre frågor innan ni börjar

1. Gå genom de olika bioklossarna och jämför med bilden ovan. Repetera deras funktion, behövs de i transkriptionen eller i translationen?
2. Start- och stoppkodon behövs också för proteinsyntesen, var finns de i era konstrukt och i vilken process har de en funktion (transkriptionen eller translationen)?
3. Varför behöver man upprepa en RBS men inte promotorn och terminatorn i ett operon?



## Uppgifter

1. Gör en bakterie som producerar bränsle.
2. Gör ett lila djur.
3. Modifiera ett djur som får ett ökat upptag av fett när det dricker mjölk.
4. Gör en växt som signalerar när den kommer i kontakt med miljögifter som tungmetaller.
5. Modifiera en vattenlevande organism så att den är blå nere i vattnet men när den kommer upp till ytan luktar banan.
6. Ta en LEGO-bit ur varje låda (organism, gen, promotor, RBS och terminator) – slumpmässigt, och sätt ihop din egna DNA-modifiering. Argumentera varför modifieringen är bra och vilka risker det kan finnas.
7. Gör ett däggdjur som regelbundet ändrar färg.
8. Gör en bakterie som producerar plast eller något annat värdefullt i laboratorium, men som dör om den skulle bli utsläppt i naturen.
9. Gör en frukt som har en färg på vinterdagar, en annan på vinternätter, en annan på sommardagar och en fjärde färg på sommarnätter.
10. Gör en organism som växlar färg mellan grön, röd och blå färg.
11. Extrauppgift: Gör en egen DNA-modifiering till en organism och be någon annan gissa vilken funktion modifieringen skulle ha.




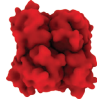





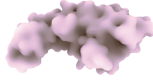

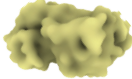





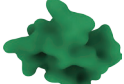




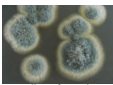


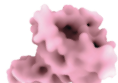
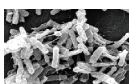
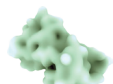
Den legobit som representerar den art som ni väljer kan placeras i början eller ovanför konstruktionen. DNA-sekvensen eller konstruktet måste innehålla en promotor, en RBS, själva genen samt en terminator. Kom ihåg att det i vissa fall kan sättas ihop konstrukt i form av ett operon. I bilden syns några olika exempel på konstrukt, men uppgifterna kan lösas på flera sätt.

### Mer information

Sök på "syntetisk biologi" på webbsidan [genteknik.se/forskningsnytt](https://genteknik.se/forskningsnytt) för att läsa om några exempel inom forskningen.

Läs om fler exempel från en internationell tävling som genomförs årligen av studenter <https://igem.org/>

# Proteiner och gener

Protein	Gen	Taget från	Proteinstruktur	Funktion
Rött fluorescerande protein	<i>rfp</i>	 <i>Discosoma sp.</i>		Ger en röd färg
Grönt fluorescerande protein	<i>gfp</i>	 <i>Aequorea victoria</i>		Ger en grön färg
Blått fluorescerande protein	<i>bfp</i>	 <i>Aequorea victoria</i>		Ger en blå färg
Bukspottkörtel-lipas	<i>pnlip</i>	 <i>Homo sapien</i>		Bryter ned fett
Alfa-Amylas	<i>amy-2</i>	 <i>aspergillus oryzae</i>		Bryter ned stärkelse till socker
Laktat-dehydrogenas	<i>ldha</i>	 <i>Bacillus stearothermophilus</i>		Gör mjölksyra
Metylsalicylat	<i>bsmt1</i>	 <i>Nicotiana tabacum</i>		Luktar som tandkräm
Topoisomeras-gift	<i>ccdB</i>	 <i>Escherichia coli</i>		Ett gift som dödar organismen
Isoamyl-acetat	<i>atf-1</i>	 <i>Musa cultivars (banan)</i>		Bananlukt
Alkohol-dehydrogenas	<i>adhE</i>	 <i>saccharomyces cerevisiae (jäst)</i>		Gör alkohol
PHB depolymeras	<i>afua-4</i>	 <i>Penicillium funiculosum</i>		Gör biologiskt plast
Polychlorobiphenyls	<i>bphA</i>	 <i>Pseudomonas pseudoaeruginosa</i>		Bryter ned kemiskt avfall
Hydrogenas	<i>hydA</i>	 <i>Clostridium acetobutylicum</i>		Gör vätgas

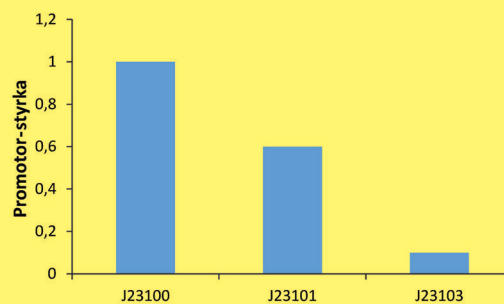
# Promotorer

Promotorer som aktiveras under vissa omständigheter

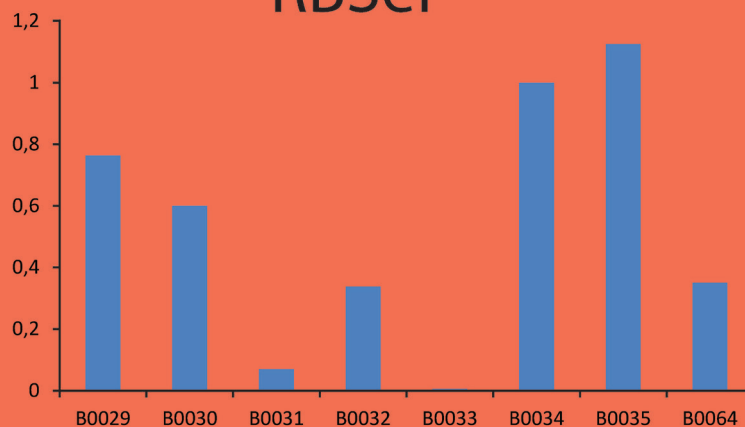
- PpsbA2** - Aktiveras av ljus
- PhetR** - Aktiveras av avsaknaden av syre
- Pnmt1** - Aktiveras av värme
- PnrsB** - Aktiveras av tungmetaller
- Plac** - Aktiveras av laktos (mjölksocker)
- J23105** - Aktiveras av alkohol
- J23114** - Aktiveras av mjölksyra
- J23110** - Aktiveras på hög höjd
- J23118** - Aktiveras under vatten
- J23102** - Aktiveras av pH-förändring

Promotorer som alltid är aktiva

- J23100** - Stark
- J23101** - Medium
- J23103** - Svag



# RBSer



En stark promotor innebär att det blir en starkare bindning mellan DNA-sekvensen, transkriptionsfaktorerna och RNA-polymeras vilket leder till att mer protein bildas. Vill man ha ett lägre uttryck av ett protein kan en svagare promotor väljas. En hög stapel för en RBS innebär att ribosomen binder starkare och mer protein bildas.