# Наноматериалы на основе биополимеров

МФК-2020

Лекция 10 (по ДНК лекция 3).

**ДНК как основа для вычислений.**

**Слайды 1-2.** Сегодня мы рассмотрим возможность использования нуклеиновых кислот для создания систем, позволяющих реализовывать вычисления. Это активно развивающееся направление, так как просматриваются принципиально новые функциональные возможности использования ДНК, к примеру, параллельных вычислений на основе ДНК. Другим примером успешного использования ДНК в этом качестве – это одновременное детектирование нескольких параметров и принятие решения о высвобождении лекарства на уровне живой клетки.

Один из подходов для реализации вычислений на основе ДНК получил название «Днк-электроника». Название включено в кавычки, так как такая терминология еще не устоялась. Впервые использовать единичная молекулы качестве составляющей компоненты электроники было предложено еще в 1974 году (Aviram и др., «Molecular rectifiers», Chem. Phys. Lett., 29, 1974). Молекулы ДНК могут обладать собственной проводимостью, что позволяет создавать молекулярные нано- провода на их основе. Молекула ДНК может участвовать в переносе заряда, имеет нанометровый размер. В этом случае «Днк- электроники» используют гибридные материалы, включающие в себя как один из компонентов - нуклеиновые кислоты.

**Слайд 3.**

Еще в 2003 году в одном из выпусков журнала *EMBO Rep.* (это журнал европейского общества молекулярных биологов, в котором часто публикуются обзоры современного состояния науки) было сформулировано, что будущее электроники состоит именно в конструировании использования бионических систем, объединяющих искусственные материалы и природные\природа- подобные молекулы: «Мир направляется к гибридной технологии, в которой транзистор будет сделан из молекул ДНК, которые связаны с углеродом нанотрубок, а другие части будут сделаны из кремния». Более детально у использования биологических молекул в составе электроники вы можете прочитать в книге посвященный конструированием бионических систем В.А. Карасев и В. В. Лучинин (каф. микроэлектроники СПбГЭТУ) «Введение в конструирование бионических наносистем».

**Слайд 4.** Измерения проводимости индивидуальной ДНК были реализованы с использованием закрепления концов одноцепочечной или двуцепочечной ДНК на углеродных нанотрубках. Схема представлена на слайде на панели А, полно атомная модель взаимодействия молекулы ДНК (вторая цепь зеленая) и углеродной нанотрубки представлена на панели B.

**Слайд 5.** Оказалось, что молекулы ДНКмогут обладать диэлектрическими, металлическими, полупроводниковыми и даже условно «сверхпроводящими свойствами». Свойства определяются: 1) последовательностью оснований в полимерной молекуле ДНК, 2) важна вода, связанная с ДНК. Стоит отметить, что определили разные свойства проводимости индивидуальным молекул ДНК в вакууме и атмосфере.

**Слайд 6.** С помощью химического синтеза исследователи улучшили электропроводность ДНК (DNA electronics a step closer, <http://www.rsc.org>, 2009). Просто замена аденина на deaza-аденин (Z на слайде) увеличила скорость переноса заряда на три порядка. Изменения в комплементарных парах на слайде отмечены красным кружком. Обычные молекулы ДНК могут пропускать прядка нескольких десятков пикоампер (пА) электрического тока, а сила тока через специально спроектированные для этого молекулы может превышать значение в 100 пА.

**Слайд 7.** Мы можем использовать блочную сборку на основе синтетических коротких днк олигонуклеотидов (сборку поверхностей из блоков мы рассматривали на 2-ой лекции блока курса МФК, посвященной использованию нуклеиновых кислот как основы материалов ) в реализации вычислений. На слайде приведен пример использования блока «четыре руки», изображенного в виде квадрата. В этом случае часть блоков заранее рассчитываются как направляющая сборку (по сути этот набор представляет собой программу, которая будет обрабатывать данные – это 2 часть блоков). При смешении всех блоков формируется решение в виде поверхности из ДНК - графической структуры, которая считывается с помощью атомносиловой микроскопии. Возможна проверка большого количества параметров (закодированных комплементарным взаимодействием рук блоков) одновременно. Детальнее подход описан по ссылке, представленной на слайде. Такой подход был предложен, но практически еще не использовался.

**Слайд 8.** Другой вариант реализации вычислений на основе ДНК - это использование системы «вытеснения цепей» (цепь – это одна молекула в двойной спирали ДНК) в качестве основы для создания логических операторов. На панели А слайда представлены схемы реализации таких операторов. На **а** проиллюстрировано, что такое вытеснение или замена цепи ДНК. Входная нить ДНК (ввод информации), связывается с фиксатором нити B (несвязанная в дуплекс часть цепи В, участвующая в образовании дуплекса BC) и вытесняет нить C, которая представляет собой выходные данные. Логические операции «и» **(b)** и «или» (**c)** могут быть образованы различными комбинациями процесса в (а). На панели Б слайда более детально проиллюстрирован принцип замены цепей в ДНК-дуплексе. ДНК-дуплекс – это вторичная структура ДНК, сформированная двумя молекулами ДНК, разнонаправленными (5’->3’ и 3’->5’) и взаимодействующими с образованием комплементарных пар (A-T, G-C) или другими словами – это короткая двойная спираль. При образовании вторичной структуры сформировать более длинный дуплекс (это тот, который содержит большее количество комплиментарных пар) энергетически выгоднее, чем сохранять короткий дуплекс (если он есть в системе). Поэтому, если у нас существует ДНК-дуплекс с выступающим одноцепочечным концом (на слайде он проиллюстрирован взаимодействием белый и красный цепей ДНК, где белая цепь более длинная и имеет выступающий одноцепочечной участок, способный к новым, дополнительным комплиментарным взаимодействия). Если в систему добавить полностью комплиментарную белой молекулу ДНК (на схеме она представлена красным), то будет происходить замена желтый цепи в коротком дуплексе (сформирован желтой и белой цепями) на дуплекс, сформированный белой и красной молекулами ДНК, а желтая цепь будет вытеснена в раствор. Желтая цепь на панели Б соответствуют цепи А панели А, **а.** Красная цепь панели Б соответствует последовательности С панели А, **а**. Белая цепь панели Б соответствует последовательности B на панели А, **а.** Таким образом, панель Б позволяет вам увидеть какие процессы происходят на уровне образования комплементарных пар, каждая комплементарная пара оснований отмечена небольшой вертикальный чертой.

**Слайд 9.** Главная возможная привлекательность создания и использования «компьютеров» на основе ДНК – это возможность решить сложные проблемы, а именно то, что различные возможные решения создаются одновременно. Это известно как параллельная обработка данных. Люди и большинство электронно-вычислительных машин попытаются решить проблему - один процесс за один раз (линейная обработка). В перспективе, больше, чем 10 триллионов молекул ДНК могут находиться в области, не большей чем 1 кубический сантиметр. Так компьютер на основе ДНК мог бы держать 10 терабайт данных и выполнить 10 триллионов вычислений за один раз.

**Слайд 10.** Использование ДНК, отличное от передачи генетического материала, но при этом использующее способность молекул образовывать двойную спираль на основе комплементарных взаимодействий, было предложено достаточно давно. Еще в 1994, программист Леонард Аделмэн предположил, что способность ДНК к комплементарности может быть использована, чтобы решать сложные математические проблемы. Аделмэн нашел способ, как использовать ДНК, чтобы решить гамильтонову проблему пути (задача коммивояжера), чье решение требовало обнаружения наиболее короткого пути прохождения всех пунктов (городов) только однажды [Adelman, 1994, Science]. Каждый город был закодирован как уникальная последовательность ДНК, а каждый отрезок пути между двумя городами – как последовательность комплементарная половине уникальной последовательности ДНК каждого из этих городов. Все последовательности ДНК гибридизовались (это процесс нагревания и охлаждения, позволяющий сформировать вторичную структуру) с образованием новых двойных спиралей. Теория считает, что решение проблемы было одной из новых двойных спиралей, содержащей последовательности **всех** городов, но только один раз, то есть наиболее короткой. Путем исключения с помощью физических методов разделения НК, правильное решение было найдено.

**Слайд 11.** Другое преимущество вычислительных систем на основе ДНК состоит в том, что такие системы могут использоваться в биологических жидкостях [Nature 429, 423-429 (2004)]. “Эти компьютеры не будут конкурировать с вычислением на основе кремния с точки зрения скорости, но их преимущество состоит в том, что они могут использоваться в жидкостях, таких как образец крови или в теле, и принимать решения на уровне единственной клетки.”

**Слайд 12.** Достаточно быстро была создана система, позволяющая играть в «крестики – нолики» с использованием молекул ДНК как логических операторов ответа системы на действия человека. Cистема, позволяющая сыграть в «крестики – нолики» таким способом, получила название MAYAI и MAYAII. Система состоит из девяти колодцев в пластиковой плашке, расположение которых напоминает сетку для игры в крестики нолики. Каждый колодец содержит набор ДНК, которые синтезированы с "красной" или "зеленой" флуоресцентной краской. Каждый шаг занимает приблизительно 30 минут.

**Слайд 13.** Для реализации такой системы кроме расчета последовательностей олигонуклеотидов, их синтеза с модификацией флуоресцентным красителем необходимо оборудование - флориметр, позволяющий считывать результат флуоресценции в колодцах после каждого шага и человек, который будет общаться с системой посредством добавления олигонуклеотидов, чтобы сделать следующий ход. В основе игры лежит описанной выше принцип «замены цепей».

**Слайд 14-16.** Исходно были рассчитаны наборы последовательностей олигонуклеотидов, которые изменяли свое вторичную структуру по принципу «замены цепей» с учетом логических операций, необходимых для ответа системы в каждом колодце при игре (слайд 14). Правило построения таких операций на основе олигонуклеотидов было рассмотрено на слайде 8. Для того, чтобы следить за появлением сигнала использовали олигонуклеотиды, ковалентно модифицированные флуоресцентным красителем. Находясь в дуплексе, такие олигонуклеотиды не обладают флуоресценцией за счет сближения при взаимодействии со 2-ой цепью флуорофора (фрагмент молекулы, придающий ей флуоресцентные свойства) с тушителем (фрагмент молекулы, который приводит к тушению флуоресценции, то есть уменьшает интенсивность флуоресценции). При высвобождении такого олигонуклеотида из дуплекса в раствор появляется флуоресцентный сигнал, которой может быть считан. На слайде 14 вы можете видеть схематическое изображение наборов олигонуклеотидов в каждом из колодцев, которые позволяют шаг за шагом получать ответ системы. В случае начала игры с центрального колодца (номер 5 на рисунке) примером ответа системы на начало игры можно увидеть на следующем слайде 15. Для того чтобы сыграть, необходимо добавить олигонуклеотиды с определенной последовательностью во все колодцы сетки, но только в центральном колодце добавление олигонуклеотида приведет к высвобождению другого флуоресцентно-меченого олигонуклеотида из дуплекса, что приведет к появлению флуоресценции (на слайде меняется цвет олигонуклеотида T с черного на красный). И в колодце (ячейке) 5 появляется красный сигнал (это начало игры). Далее человек решает пойти «0» в 9 ячейку и для этого во все ячейки системы добавляется олигонуклеотид 9-1, который приводит к реорганизации вторичных структур во всех ячейках системы, что приводит к появлению «зеленого» сигнала в 9 ячейке (визуализация хода человека) и ответу системы в колодце 2. Все ответы исходно запрограммированы последовательностями наборов олигонуклеотидов в ячейках.

**Слайд 17.** Использование последовательности DNAzyme приводит к расширению возможностей вычислений. Такие последовательности могут быть интегрированы в вычислительные системы на основе нуклеиновых кислот. DNAzyme — это особые последовательности ДНК, которые образуют пространственную структуру, выполняющую функцию фермента. Известны такие последовательности, которые приводят к катализу разрыва фосфо- диэфирной связи в определенном месте нуклеиновой кислоты. Использование DNAzyme возможно для построения логических ворот - внесение разрыва может физически разобщить флуорофор и тушитель на разных концах нуклеиновой кислоты. Включение последовательности DNAzyme может привести к созданию вероятностных автоматов или систем, отвечающих на воздействие с определенной вероятностью.

Если суммировать другие возможности использования последовательности DNAzyme, то стоит вспомнить, что они могут служить маршрутизаторами в процессе сборки сложных наночастиц, с помощью DNAzyme реализовываться контроль загрузки транспортных наночастиц. Также последовательности DNAzyme могут быть использованы для ответа на внешние изменения биосистемы, например на появлние мРНК (такой пример рассмотрим далее).

**Слайды 18-19.** В другой работе был предложен даже первый простой язык программирования с выполнением молекулярного масштаба [Nature Nanotechnology 4, 642 - 648 (2009)] на основе использования конечного автомата Бенсона-Шапиро. Это ДНК система, способная к выполнению простых логических выводов. Компилятор переводит факты, правила и вопросы в их молекулярные представления и впоследствии управляет автоматизированной системой, которая собирает логические выводы и поставляет результат. Ферменты которые называют энуклеазы рестрикции узнают палиндром в последовательности ДНК и вносят разрыв в фосфо- диэфирную связь молекулы ДНК. Найденны ферменты этого класса, у которых сайт узнавания ДНК и сайт разрезания разнесены в пространстве. Это позволило использовать такие ферменты для проверки соответствия комплементарности фрагментов нуклеиновых кислот. На слайде 18 фермент представлен рисунком прямоугольника с белой полостью с 2-мя стрелочками, отмечающими места внесения разрыва в 2 цепи ДНК, которые далее сайта связывания фермента на 9 нуклеотидов и 13 нуклеотидов. Сайт связывания отмечен белым квадратом. Последовательность дуплекса, которая узнается этим ферментом, отмечена голубым цветом и называется сайтом связывания на фермента на ДНК. Он находится в коротком дуплексе, у которого есть одноцепочечной выступающий конец, который комплементарен выступающему концу второго дуплекса (на схеме отмечено комплиментарные концы). Когда правило комплементарности выполняется у нас образуется длинный, по сравнению с исходными, дуплекс и на расстоянии 9 и 13 нуклеотидов от сайты связывания фермента физически появляется ДНК-дуплекс, сформированный из 2-х исходных дуплексов и таким образом собирается активный комплекс ДНК – фермент. Фермент вносит в разрыв молекулу ДНК как в 1-ну так и в комплементарную цепь дуплекса. В результате появляется следующая последовательность (одно-цепочный участок, готовый к проверке).

**Слайд 20-21.** Давайте с вами рассмотрим возможность использования такого молекулярного языка программирования для решения задачи: человек смертен. Бог – нет. Сократ человек. Программа должна ответить на вопросы: смертен для Сократ? Для этого необходимо перевести наши утверждения в молекулярные представления. Нам необходимо иметь молекулярные представления фактов: человек — это Сократ, правила - смертный – это человек или каждый человек смертен. Система может ответить на вопросы такие как Сократ смертен? (и другие). На следующем слайде мы видим с вами молекулярные выражение вопроса и правила. «Предположение» или «вопрос» и правило — это дуплексы, а «значение» — это олигонуклеотид, образующей шпильку. Правильность предположения определяется выполнением комплементарности. Есть еще вспомогательная цепь.

**Слайд 21-22.** В «предположении» у нас закодирован ответ. Система дуплекса «предположения» состоит из олигонуклеотидов ковалентно-модифицированных флуоресцентный меткой и тушителем (на схеме такие фрагменты молекул обозначены Ф и Т, соответственно). На 1 этапе происходит проверка соответствия «вопроса» и «значения», мы на молекулярном уровне отвечаем на вопрос: Сократ человек? При этом идет проверка комплементарности выступающего конца дуплекса «вопроса» и выступающего конца «значения». В случае комплементарности этих одноцепочечных участков образуется длинный дуплекс, который содержит сайт узнавание ферментом (красный). Фермент вносит разрывы через 9 и 13 нуклеотидов от сайта узнавания. В результате внесения разрывов в цепь ДНК сформируется новый фрагмент ДНК. Этот фрагмент способен взаимодействовать с дополнительный цепью или вспомогательный цепью.

**Слайд 23.** В результате такого взаимодействия сформируется новый дуплекс. Этот дуплекс также содержит сайт узнавание ферментом (отмечен красным) и имеет выступающий конец, который может взаимодействовать с выступающим концом комплекса «предположение». В том случае, если такое взаимодействие реализуется, происходит формирование длинного дуплекса и в результате фермент внесет разрыв в цепи дуплекса «предположение» и произойдет его расщепления, что приведет к расхождению флуорофора и тушителя в пространстве. Это приведет возникновению флуоресценции и появлению сигнала, отвечающего на вопрос положительно.

**Слайд 24-26.** Слайды 24 и 25 схематично описывают тот же язык программирования молекулярного выражения на основе ДНК. Общая схема молекулярного выражения представлена на слайде 24. Представлена проверка вопроса: Смертен (Платон)? С учетом того, что человек смертен, греки – это люди, Платон и Сократ – это греки. (слайд 25). Показано, что возможна проверка нескольких утверждений и выполнения нескольких условий одновременно. Это слайд 26, программа которого позволяет ответить на вопрос счастлив ли Маслов. Ответ – да, он счастлив появится только в том случае, если будут проверены и выполнены два условия: что он находится в состоянии любви и у него есть деньги

**Слайд 26.** Использование такого молекулярного языка программирования было предложено для создания автономного молекулярного компьютера для логического контроля экспрессии генов. Это результаты, которая была опубликованы в журнале Nature в 2004 году.

**Слайды 27-30.** В случае некоторых болезней происходят изменения уровня экспрессии определенных матричных РНК (мРНК). Можно поставить диагноз на основе повышения уровня таких молекул в клетке и запрограммировать высвобождение лекарства на молекулярном уровне. Постановка диагноза возможна в том случае, если будет выполнено последовательно Несколько условий. В работе было реализовано такое решение для клеток рака легкого и рака простаты. Рассмотрим детальнее изменения в клетках рака простаты. 4 условия должны быть выполнены. Количество 2-х мРНК будет снижена и 2-х повышена (PPAP2B↓, GSTP1↓, PIM1↑, HPN↑). Алгоритм принятия решения представлен на слайде 30. На слайде 31 вы можете как снижение мРНК PPAP2B приводит к изменению строения дуплекса, а на слайде 32 можно увидеть полное молекулярное выражения для программы. В случае постановки правильного диагноза молекулярная система высвободит олигонуклеотид, который будет снижать экспрессию другой мРНК (MDM2) и за счет этого обладать лечебным действием. К сожалению, эта система была реализована только на клетках клеточных линий. Безопасных и эффективных способов доставки набора олигонуклеотидов в клетки организма на данный момент не существует.