



Politechnika Śląska
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki

Instytut Informatyki

Rozszerzenie biomolekularnego automatu Shapiro

(Autoreferat rozprawy doktorskiej)

Sebastian Sakowski

Promotor:

Dr hab. Tadeusz Krasiński

Uniwersytet Łódzki

Wydział Matematyki i Informatyki

Gliwice 2010

Rozszerzenie biomolekularnego automatu Shapiro

(Autoreferat rozprawy doktorskiej)

Sebastian Sakowski

Doktorant w Instytucie Informatyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach

1. Cel i teza pracy

Możliwe jest teoretyczne i praktyczne (eksperymentalne) rozszerzenie 2-stanowego automatu Shapiro do większej ilości stanów przez zastosowanie wielu enzymów restrykcyjnych działających autonomicznie w jednej mieszaninie.

Cele pracy:

1. Konstrukcja 6-stanowego 2-symbolowego automatu skończonego za pomocą łańcuchów DNA z zastosowaniem dwóch enzymów restrykcyjnych działających w jednej mieszaninie.
2. Podanie warunków arytmetycznych możliwości rozszerzenia automatu Shapiro do p stanów i r symboli, z uwzględnieniem długości kodów symboli n i długości lepkich końców k_1, \dots, k_j pozostających po działaniu j enzymów restrykcyjnych.
3. Wykonanie eksperymentu laboratoryjnego polegającego na praktycznym sprawdzeniu idei zwiększania liczby stanów automatu przez zastosowanie dwóch enzymów restrykcyjnych działających autonomicznie w jednej mieszaninie na słowie wejściowym.

2. Wstęp

W ostatnich latach informatykę zaczęto określać jako dyscyplinę nauki o przetwarzaniu, przechowywaniu i przekazywaniu informacji w dowolnym środowisku, a więc zarówno opartym na elektronice, jak i na mechanice kwantowej, czy genetyce molekularnej [9]. W chwili obecnej rozwiązania oparte na kwantach i łańcuchach DNA są jednak we wczesnym etapie rozwoju. W niedalekiej przyszłości spodziewać się jednak należy znacznego rozwoju tych technologii. Obecnie prowadzone badania naukowe nad nowymi technologiami mogącymi zastąpić konwencjonalne komputery, koncentrują się głównie na dwóch nowych możliwościach: obliczeniach kwantowych oraz DNA obliczeniach. Bardzo obiecujące wydaje się zastosowanie DNA, czyli związku chemicznego kodującego informacje w organizmach żywych, gdyż DNA ze względu na swoje właściwości może zostać użyte do kodowania, przetwarzania i magazynowania informacji. Dzięki bardzo małym rozmiarom, możliwościom dużego upakowania informacji oraz zgodności z organizmami żywymi DNA ma bardzo duży potencjał jako materiał do budowy urządzeń mogących przetwarzać informację w bardzo szczególnych warunkach np.: biochipów analizujących choroby, a także innych nowoczesnych nanomaszyn.

Dynamiczny rozwój badań nad możliwościami wykonywania DNA obliczeń rozpoczął się w 1996 roku od eksperymentu Leonarda Adlemana [1], jednego z współautorów szyfrowania RSA. Zastosował on łańcuchy DNA do znanego problemu informatycznego (problemu drogi Hamiltona w grafie). Od tego czasu dziedzina ta znacznie rozwinęła się. Pojawiły się różne teoretyczne rozważania oraz praktyczne implementacje obliczeń za pomocą DNA. Badania doświadczalne nad DNA obliczeniami koncentrują się głównie na praktycznym zaimplementowaniu, metodami inżynierii genetycznej, znanych algorytmów informatycznych za pomocą odpowiedniego konstruowania łańcuchów DNA. Badania te mają na celu udowodnienie, że możliwe jest rozwiązywanie problemów informatycznych przez kodowanie danych wejściowych łańcuchami DNA, a następnie ich przetwarzania z użyciem znanych operacji na DNA. Często są to problemy NP-zupełne, które można szybciej rozwiązać korzystając z masowej równoległości wykonywanych obliczeń. Świadczy to o potencjalnej przewadze DNA obliczeń nad klasyczną implementacją za pomocą przepływu elektronów.

W 2001 roku grupa naukowców z Instytutu Weizmanna (Shapiro i inni) [2] opracowała programowalny automat skończony. Badania te, kontynuowane w [3] i [4], udowodniły, że możliwe jest autonomiczne i programowalne przetwarzanie informacji za pomocą naprzemiennych operacji cięcia i łączenia łańcuchów DNA. Model ten ograniczony jest jednak do dwóch stanów i dwóch symboli. Wszystkie elementy tej prostej 2-stanowej 2-symbolowej niedeterministycznej maszyny

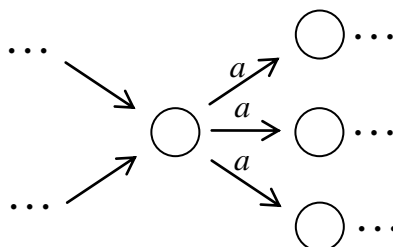
zbudowane są z łańcuchów DNA oraz jednego enzymu restrykcyjnego (*FokI*). Naprzemienne cięcie i łączenie łańcuchów DNA reprezentujących poszczególne elementy automatu doprowadza do sekwencji terminalnej, której obecność w roztworze oznacza akceptację słowa wejściowego. Automat Shapiro z teoretycznego punktu widzenia reprezentuje prosty model. Dążąc do uniwersalnych DNA obliczeń, konieczne jest w pierwszej kolejności zbadanie możliwości rozszerzania tego automatu. Autorzy prac [2], [3], [4] nie podają jednak możliwości dalszego rozszerzania automatu 2-stanowego 2-symbolowego. Zwracają uwagę, że odkrycie enzymów restrykcyjnych pozostawiających dłuższe lepkie końce umożliwi rozszerzenie ich automatu. Zespół Shapiro i inni podaje, że możliwe jest zakodowanie za pomocą lepkich końców, powstałych po cięciu enzymem *FokI*, automatu co najwyżej 3-stanowego. Ograniczenie wynika z długości lepkich końców. Doświadczalne rozszerzenie automatu Shapiro do trzech stanów zostało wykonane przez dwa zespoły badawcze [8], [10].

W pracy doktorskiej przedstawiona została nowa idea rozszerzenia automatu Shapiro polegająca na zwiększeniu liczby enzymów restrykcyjnych działających autonomicznie w jednej mieszaninie. Podane zostało kodowanie łańcuchami DNA wszystkich elementów 6-stanowego 2-symbolowego automatu skończonego z wykorzystaniem dwóch enzymów restrykcyjnych (*BseXI* oraz *Eco57I*). Określone zostały również warunki arytmetyczne konieczne do dalszego rozszerzania automatu Shapiro. W pracy zaproponowano również tworzenie „bibliotek łańcuchów DNA”, które umożliwiają wielokrotne użycie raz przygotowanych łańcuchów DNA. Eksperyment laboratoryjny potwierdził doświadczalnie możliwość rozszerzania automatu Shapiro do większej liczby stanów z zastosowaniem dwóch innych enzymów restrykcyjnych (*AcuI*, *BbvI*). Warto podkreślić, że nikt wcześniej nie zademonstrował praktycznego wykorzystania dwóch enzymów restrykcyjnych jednocześnie do przeprowadzania obliczeń na łańcuchach DNA (teoretyczna próba zastosowania wielu enzymów podana jest w pracy [7]). Praktyczna implementacja laboratoryjna wykonana została w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego.

3. Dwustanowy automat Shapiro

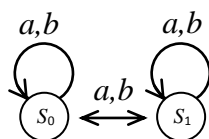
Pierwsze teoretyczne modele obliczeń powstały na początku dwudziestego wieku w głowach matematyków, a dokładniej logików matematycznych zajmującymi się podstawami matematyki. Ich celem nie były komputery, których jeszcze nie wymyślono, ale problemy takie jak: precyzyjne pojęcie algorytmu, pojęcie funkcji obliczalnej, automatyczne dowodzenie twierdzeń. Te teoretyczne prace stały się podstawą budowy komputerów, opartych na przepływie elektronów. Każdy model

urządzenia obliczającego, nawet prostego urządzenia zbudowanego z DNA, powinien być implementacją jednego ze znanych modeli teoretycznych. Wyróżniamy trzy podstawowe teoretyczne modele urządzeń obliczających: automaty skończone, automaty ze stosem oraz maszyny Turinga. Najprostszym modelem obliczeń jest automat skończony, mogący przyjmować skończoną liczbę stanów. Ma on niewielką moc obliczeniową i może być stosowany do rozwiązywania prostych problemów. Automaty skończone jednoznacznie (deterministycznie) określające stan po wczytaniu kolejnego symbolu słowa wejściowego nazywamy deterministycznymi automatami skończonymi. Pewnym uogólnieniem deterministycznych automatów skończonych są niedeterministyczne automaty, które różnią się od poprzednich tym, że po wczytaniu kolejnego symbolu słowa mogą przejść w jeden z kilku możliwych stanów. W grafie automatu niedeterministycznego mogą istnieć różne drogi dla tego samego słowa (Rys. 1).



Rys. 1. Niedeterminizm automatu skończonego.

W 2001 roku Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro [2] przedstawili implementację laboratoryjną niedeterministycznego automatu skończonego zbudowanego z DNA (będziemy go nazywali automatem Shapiro). Idea budowy automatu Shapiro zbliżona jest do hipotetycznego biomolekularnego urządzenia opracowanego w 1973 roku przez CH. Bennetta [5] oraz do teoretycznego modelu Maszyny Turinga zbudowanej z DNA i przedstawionej w 1995 roku przez P. Rothemunda [7]. Zespół pod kierunkiem E. Shapiro [2], [3] udowodnił jednak, że możliwe jest praktyczne skonstruowanie programowalnych automatów skończonych zbudowanych z DNA, działających autonomicznie tzn. bez dodatkowej pośredniej ingerencji człowieka, za wyjątkiem wprowadzenia danych wejściowych oraz „odczytania” danych wyjściowych. Odpowiednie kodowanie stanów oraz symboli za pomocą DNA umożliwiło autorom budowę dowolnego 2-stanowego 2-symbolowego automatu skończonego. Ma on $8=2^3$ możliwych ruchów (przejść), które przedstawione są na poniższym rysunku.

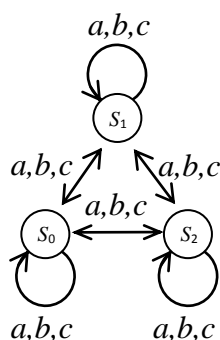


Rys. 2. Możliwe przejścia automatu 2-stanowego.

Automat Shapiro umożliwia przeprowadzenie autonomicznego i programowalnego przetwarzania informacji za pomocą wyboru odpowiedniego zestawu łańcuchów DNA reprezentujących reguły przejść. Model automatu 2-stanowego 2-symbolowego przedstawiony został za pomocą zbioru odpowiednio dobranych łańcuchów DNA reprezentujących elementy teoretycznego modelu automatu skończonego. Konieczne było zatem zakodowanie za pomocą DNA: symboli, krawędzi (czyli przejść) oraz stanów (w tym stanu początkowego i końcowego).

Dodatkowym elementem budowy automatu Shapiro jest enzym *FokI* (odpowiednik teoretyczny głowicy automatu skończonego), czyli związek chemiczny umożliwiający wykonywanie operacji cięcia łańcuchów DNA. Enzym *FokI* rozpoznaje określoną sekwencję zasad azotowych w łańcuchu DNA, a dokładniej sekwencję GGATG w kierunku 5'→3'. Badania laboratoryjne E. Shapiro i innych [2],[3], udowodniły, że możliwe jest autonomiczne i programowalne przetwarzanie informacji za pomocą naprzemiennych operacji cięcia i łączenia łańcuchów DNA. Model ten ograniczony był jednak do dwóch stanów i dwóch symboli (automat 2-stanowy 2-symbolowy). Badania przedstawione przez zespół Shapiro skupiły uwagę wielu badaczy. Prowadzono dalsze prace zmierzające do rozszerzenia liczby stanów oraz akceptowanych symboli.

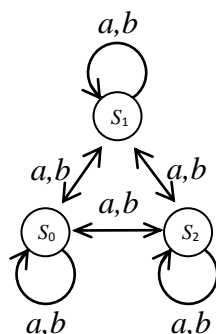
W 2005 roku Soreni i inni [8] przedstawili możliwość wykonania praktycznego (laboratoryjnego) automatu, opartego na cięciu i łączeniu łańcuchów DNA, o większej liczbie stanów i symboli (automat 3-stanowy 3-symbolowy).



Rys. 3. Wszystkie możliwe przejścia dla automatu 3-stanowego 3-symbolowego.

Autorzy przedstawili również koncepcję umieszczenia wejściowego łańcucha DNA na płycie reprezentującej mikromacierz. Cały proces przetwarzania oraz sposób konstruowania słowa wejściowego zbliżony jest do metody użytej w automacie Shapiro. Różnica polegała na wykorzystaniu innego enzymu restrykcyjnego - *BbvI* oraz umieszczeniu biotyny na końcu łańcucha DNA reprezentującego słowo wejściowe, dzięki czemu cały proces przetwarzania informacji mógł odbywać się z wykorzystaniem płytki reprezentującej mikromacierz. Autorzy opracowali bibliotekę 27 łańcuchów DNA reprezentującą wszystkie możliwe przejścia dla automatu 3-stanowego 3-symbolowego.

W 2004 rok Unold, Troć, Dobosz, Trusiewicz [10], grupa naukowców z Wrocławia, rozszerzyła i zweryfikowała w laboratorium automat Shapiro o trzech stanach stosując inny enzym restrykcyjny *BseMII*. Kodowanie za pomocą łańcuchów DNA umożliwiło autorom opracowanie modelu 3-stanowego 2-symbolowego (Rys. 4) w którym autorzy zakodowali za pomocą łańcuchów DNA 18 możliwych przejść.

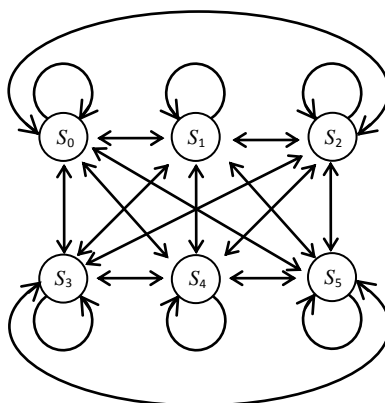


Rys. 4. Wszystkie możliwe przejścia dla automatu 3-stanowego 2-symbolowego.

4. Rozszerzenie automatu Shapiro

Zespół Shapiro podaje, że automat oparty na enzymie *FokI* może być rozszerzony maksymalnie do trzech stanów oraz zwracają uwagę, że odkrycie enzymów restrykcyjnych pozostawiających po cięciu dłuższe lepkie końce mogłoby zwiększyć złożoność automatów.

W pracy doktorskiej przedstawiona została nowa idea rozszerzenia automatu Shapiro, która polega na zwiększeniu liczby działających enzymów w jednej mieszance (w jednej probówce) [6]. Podano rozszerzenie modelu automatu Shapiro do 6-stanów przez zastosowanie dwóch enzymów restrykcyjnych działających w jednej mieszance. Enzymy zostały tak dobrane, że działając na słowie wejściowym (tnąc słowo wejściowe) pozostawiają dwa rodzaje lepkich końców. Umożliwia to zakodowanie większej ilości przejść automatu (dokładnie 72 przejścia) i jest wystarczające dla modelu 6-stanowego 2-symbolowego (Rys. 5).



Rys. 5. Wszystkie możliwe przejścia dla 6-stanowego automatu.

Wszystkie krawędzie tego grafu posiadają etykietę: a , b . Ze względu na złożoność grafu etykiety te nie zostały umieszczone na rysunku 5. W modelu tym użyto dwa enzymy restrykcyjne *BseXI* oraz *Eco57I*, które po wykonaniu cięcia łańcucha DNA pozostawiają dwa rodzaje lepkich końców. Pierwszy enzym (o nazwie *BseXI*) rozpoznaje sekwencję GCAGC i tnie łańcuch DNA po 8 nukleotydach w kierunku $5' \rightarrow 3'$ oraz po 12 nukleotydach w kierunku $3' \rightarrow 5'$. Drugi enzym (o nazwie *Eco57I*) użyty w modelu rozpoznaje sekwencję CTGAAG i tnie łańcuch DNA po 16 nukleotydach w kierunku $5' \rightarrow 3'$ oraz po 14 nukleotydach w kierunku $3' \rightarrow 5'$. Proces przetwarzania informacji w 6-stanowym automacie jest zbliżony do działania automatu Shapiro. Pierwszym etapem jest wybór automatu, który uzyskuje się przez wybór odpowiednich przejść z 72 możliwych dla 6-stanowego 2-symbolowego automatu oraz umieszczenie odpowiadających im kodów w postaci łańcuchów DNA w probówce. Kolejnym etapem jest umieszczenie w probówce słowa wejściowego $x \in \{a, b\}^*$ oraz enzymów (*BseXI*, *Eco57I*). Stopniowa analiza słowa wejściowego x przebiega przez naprzemienne cięcie i łączenie łańcuchów DNA realizowane enzymami restrykcyjnymi (cięcie) oraz enzymem o nazwie *ligaza* (łączenie). Proces cięcia i łączenia przebiega automatycznie i autonomicznie, aż do całkowitego strawienia łańcuchów DNA i pojawienia się w roztworze określonej sekwencji nukleotydów (sekwencji terminalnej t) – oznacza to zakończenie działania automatu.

W pracy doktorskiej przedstawiono również teoretyczne rozważania dotyczące możliwości rozszerzeń automatu Shapiro do dowolnej ilości stanów i dowolnej ilości symboli. Podano arytmetyczne warunki, kiedy jest to możliwe. Ponieważ rozważania te są teoretyczne, więc przyjęto również dowolną ilość symboli, za pomocą których kodujemy symbole danego alfabetu Σ (zamiast przyjętych w komputerach biomolekularnych 4 symboli A, T, G, C). W pracy podano następujące twierdzenia.

Twierdzenie 1 Możliwa jest konstrukcja automatu Shapiro o p stanach i r symbolach, w których kodujemy symbole ciągami n elementowymi o wyrazach ze zbioru q elementowego oraz używamy jednego enzymu restrykcyjnego pozostawiającego po cięciu k wyrazowy lepki koniec ($1 \leq k \leq n$), gdy:

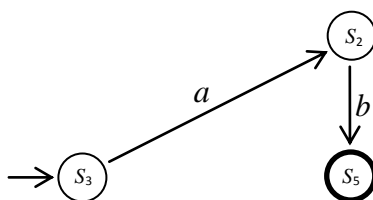
1. $p = n - k + 1$ (wystarczy $p \leq n - k + 1$),

2. $q^k > \frac{(rn - k)(rn - k + 1)}{2}$.

W pracy doktorskiej zbadano również przypadek zastosowania większej ilości enzymów. Uogólniono powyższe twierdzenie na przypadek, w którym użyto j enzymów restrykcyjnych.

5. Praktyczna implementacja laboratoryjna

Teoretyczne rozważania dotyczące możliwości rozszerzania automatu Shapiro przez zastosowanie wielu enzymów restrykcyjnych potwierdzone zostały doświadczalnie. W pracy doktorskiej omówiono eksperyment mający na celu laboratoryjne sprawdzenie działania modelu 6-stanowego opracowanego z zastosowaniem dwóch enzymów restrykcyjnych. Doświadczenie to zostało wykonane w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Testowany był laboratoryjnie następujący automat działający z zastosowaniem dwóch enzymów restrykcyjnych (*AcuI*, *BbvI*), autonomicznie w jednej mieszaninie (działających dokładnie tak samo jak użyte teoretycznie *BseXI*, *Eco57I*, ale w tych samych warunkach środowiska reakcyjnego).



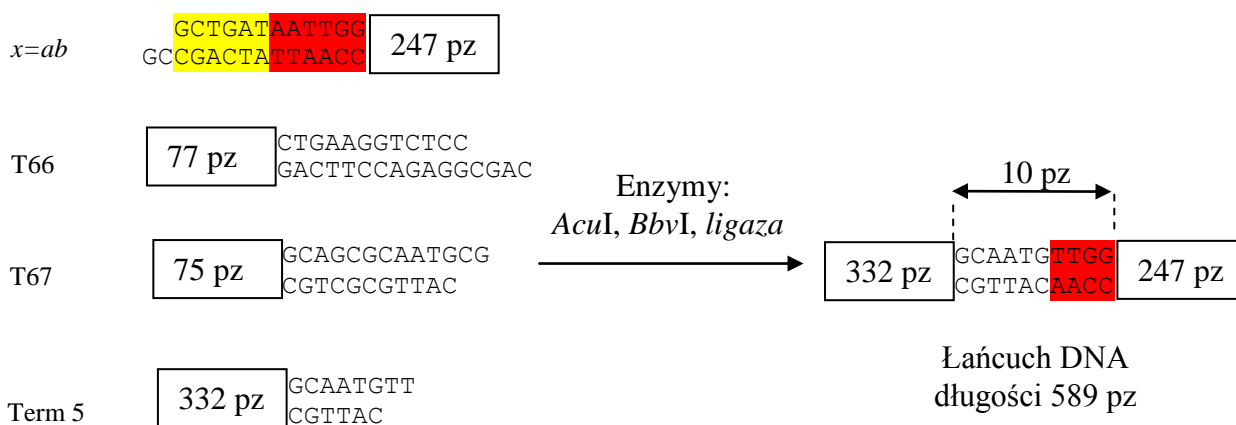
Rys. 6. Automat M testowany w doświadczeniu.

Wybrane zostały przejścia: T66 oraz T67 (w postaci łańcuchów DNA) ze zbioru 72 przejść kodowanych łańcuchami DNA i reprezentujących wszystkie możliwe przejścia dla automatu 6-stanowego 2-symbolowego. Stanem początkowym jest stan S_3 , a końcowym S_5 . Automat M został tak dobrany, aby do pozytywnego zakończenia działania automatu na słowie $x=ab$ (tzn. akceptacji tego słowa) konieczne było trawienie łańcucha DNA (reprezentującego słowo wejściowe) dwoma enzymami restrykcyjnymi: *AcuI* oraz *BbvI*. Głównym zagadnieniem było sprawdzenie laboratoryjne możliwości naprzemiennego cięcia dwoma enzymami restrykcyjnymi słowa wejściowego wykonane autonomicznie w jednej mieszaninie.

Zanim jednak wykonano właściwy eksperyment przygotowano poszczególne elementy automatu w postaci łańcuchów DNA. W tym celu zamówiono jednoniciowe syntetyczne oligonukleotydy do których za pomocą enzymu *kinazy polinukleotydowej* przyłączono grupę fosforanową, co umożliwiło późniejsze wklonowanie fragmentów DNA do wektora plazmidowego. Następnie oligonukleotydy te przekształcono w dwuniciowe fragmenty DNA na drodze renaturacji poprzez podgrzanie mieszaniny zawierającej dwa komplementarne do siebie oligonukleotydy i stopniowe ochłodzenie mieszaniny do temperatury pokojowej. Sekwencje oligonukleotydów zostały tak dobrane, aby możliwe było wytworzenie odpowiedniej struktury końców dla zapewnienia poprawnego działania automatu poprzez trawienie DNA komercyjnie dostępnymi enzymami

restrykcyjnymi. W kolejnym etapie dwuniciowe fragmenty DNA zostały wklonowane do wektora plazmidowego i wprowadzone do bakterii *Escherichia coli*. Takie podejście eksperymentalne umożliwiło wielokrotne wykorzystanie raz skonstruowanych sekwencji. Zastosowany plazmid pJET 1.2 oprócz miejsca do klonowania zawiera również krótki odcinek DNA zawierający wiele miejsc rozpoznawanych przez różne enzymy restrykcyjne (polilinker, *ang. multiple cloning site*) oraz sekwencję promotorową polimerazy T7 umożliwiającą analizę sekwencyjną oraz konstrukcję fragmentów DNA w oparciu o miejsca restrykcyjne położone w polilinkerze oraz w obrębie wklonowanych fragmentów DNA. Poprawność otrzymanych klonów sprawdzono za pomocą analizy restrykcyjnej oraz sekwencyjnej. Sekwencjonowanie otrzymanych klonów przeprowadzono w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN w Warszawie.

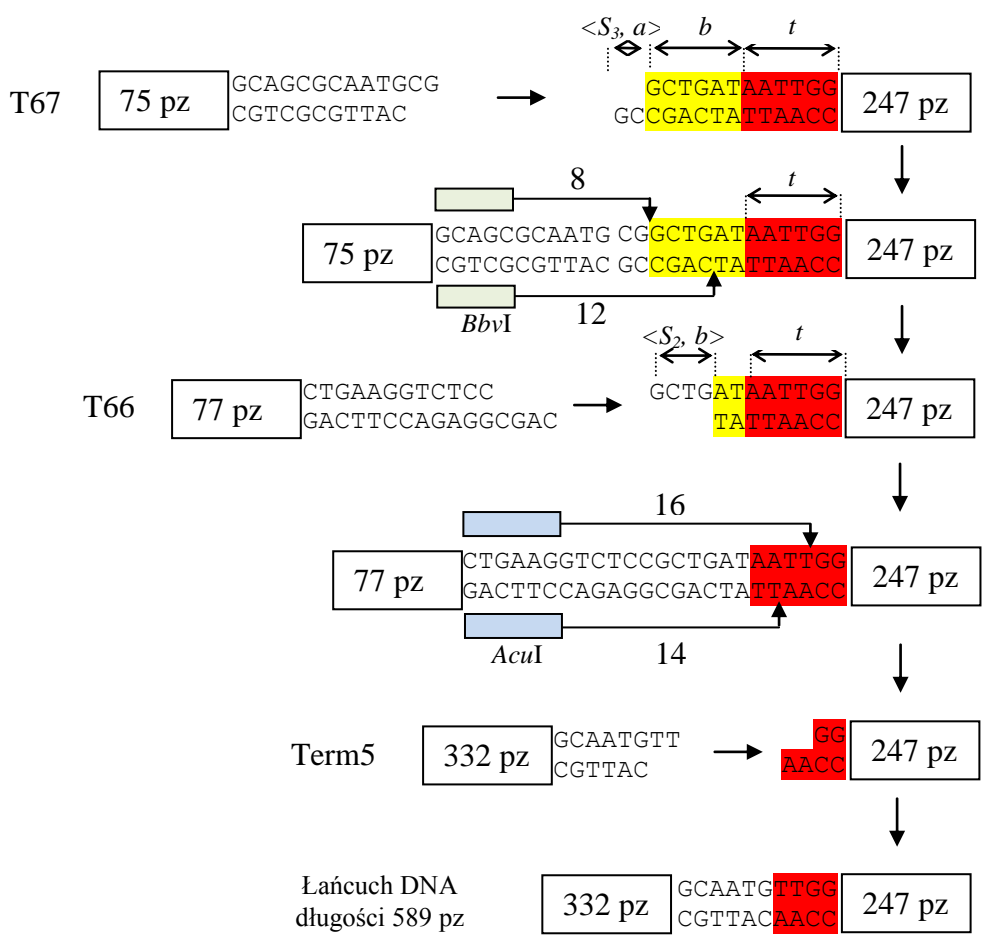
Działanie automatu badano umieszczając w probówce: słowo $x=ab$ w postaci łańcuchów DNA, przejście T66 w postaci łańcuchów DNA, przejście T67 w postaci łańcuchów DNA, sekwencję terminalną Term 5 w postaci łańcuchów DNA, enzymy restrykcyjne (*AcuI*, *BbvI*) i *ligazę*. Autonomiczne cięcie (dwie endonukleazy *AcuI* i *BbvI*) i łączenie (*ligaza*) fragmentów DNA kodujących badany automat powinno doprowadzić do powstania lepkiego końca komplementarnego jedynie do fragmentu DNA reprezentującego sekwencję terminalną odpowiadającą stanowi końcowemu S_5 . W roztworze pojawi się łańcuch DNA o długości 589 pz (Rys. 8), który może powstać jedynie w wyniku prawidłowego działania badanego automatu i jest on znacznie dłuższy od pozostałych fragmentów DNA (340 pz, 261 pz, 93pz, 88 pz).



Rys. 8. Schemat ideowy doświadczenia.

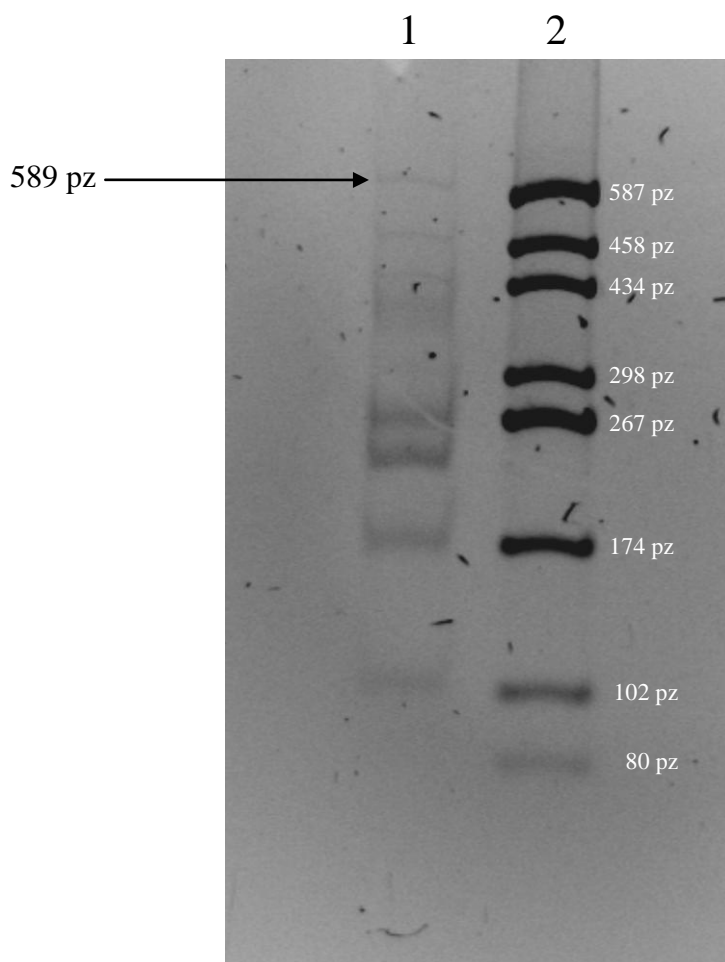
Przy prawidłowym przebiegu doświadczenia automat kończy działanie w stanie S_5 . Wtedy możliwe jest przyłączenie się lepkiego końca fragmentu terminalnego (Term 5) do lepkiego końca powstałego po działaniu enzymów (*AcuI*, *BbvI*) na słowie $x=ab$. Zatem pojawi się łańcuch o długości 589 pz. Łańcuch tej długości może pojawić się w roztworze jedynie w przypadku, gdy cały proces przetwarzania informacji przebiegł prawidłowo. Obecność tego łańcucha oznacza również, że słowo $x=ab$ zostało zaakceptowane przez automat.

Na rysunku 9 przedstawiony został planowany przebieg eksperymentu. Stopniowe trawienie (analiza) słowa dwoma enzymami restrykcyjnymi doprowadza do powstania lepkiego końca AA, a następnie komplementarnego przyłączenia łańcucha DNA długości 340 pz (lepki koniec TT) i prawidłowego zakończenia działania automatu - akceptacji słowa $x=ab$.



Rys. 9. Działanie badanego automatu.

Doświadczenie laboratoryjne zostało wykonane z użyciem metod genetyki molekularnej np.: klonowanie, trawienie endonukleazami, elektroforeza. Mieszanina reakcyjna zawierała wszystkie elementy automatu niezbędne do jego prawidłowego działania. Całość inkubowano przez 1,5 h w temperaturze 37 °C. Produkt reakcji oczyszczono trzykrotnie mieszaniną fenol:chloroform:alkohol izoamylowy (25:24:1), a następnie rozdzielono metodą elektroforezy w 8% żelu poliakrylamidowym (Rys. 10).



Rys. 10. Rozdział elektroforetyczny produktów powstałych po zakończeniu działania automatu. Kanały: 1 - produkt powstały po zakończeniu działania automatu (autonomiczne działanie dwóch endonukleaz *AcuI* oraz *BbvI*); 2 - standard wielkości DNA uzyskany z pUC19/*HaeIII*.

Analiza preparatu poreakcyjnego zawierającego fragmenty DNA powstałe w wyniku autonomicznego działania dwóch enzymów restrykcyjnych w jednej mieszaninie pozwoliła na identyfikację fragmentów DNA o oczekiwanej wielkości tzn. 589 pz. Analiza zdjęcia wykonanego po elektroforezie na żelu poliarylamidowym wskazuje, że przetwarzanie informacji (działanie automatu) zaszło według oczekiwań, co potwierdza słuszność idei zwiększania liczby enzymów działających w jednej mieszaninie w celu zwiększania liczby stanów w automacie Shapiro.

W trakcie eksperymentu, omówionego powyżej, używano różnych łańcuchów DNA o ściśle określonych długościach i sekwencjach nukleotydów. Ze względu na pracochłonność metod genetyki molekularnej przygotowanie takich łańcuchów DNA jest kluczowym etapem implementacji. W rozprawie zaproponowano tworzenie łańcuchów DNA (poprzez klonowanie w wektory plazmidowe), aby umożliwić ich wielokrotne wykorzystanie oraz łatwe powielenie.

6. Wnioski końcowe

Głównym celem pracy było określenie możliwości rozszerzenia automatu Shapiro. W pracy podano nową ideę rozszerzenia automatu Shapiro, polegającą na zastosowaniu dwóch enzymów restrykcyjnych działających autonomicznie w jednej mieszaninie. Enzymy dobrano w taki sposób, aby pozostawiały dwa rodzaje lepkich końców na trawionym słowie wejściowym. Umożliwiło to zakodowanie wszystkich 72 przejść dla modelu automatu skończonego 6-stanowego 2-symbolowego. Wymagało to odpowiedniego dobrania lepkich końców, gdyż kodują one wszystkie pary <stan,symbol> automatu. Również enzymy restrykcyjne zostały tak dobrane, aby odległości od sekwencji rozpoznawanej były stosunkowo duże. Zwiększyło to możliwości sterowania działaniem enzymów restrykcyjnych na słowie wejściowym. Ze względu na konieczność jednoznacznego kodowania informacji (aktualny stan i wczytany symbol) każdy lepki koniec musiał być unikalny tzn. różnić się od pozostałych sekwencją zasad azotowych.

Do zalet automatów opartych na enzymach restrykcyjnych można zaliczyć masową równoległość zachodzącego procesu przetwarzania informacji. Zauważalne są jednak ograniczenia techniczne i teoretyczne automatu Shapiro. Pierwszym problemem są lepkie końce, gdyż w praktyce laboratoryjnej mają one stosunkowo małe długości (od 1 do 5 nukleotydów) i w konsekwencji mogą kodować niewiele symboli. Zastosowanie wielu enzymów restrykcyjnych powoduje z kolei konieczność określenia warunków laboratoryjnych dla działania enzymów w jednej mieszaninie, gdyż na ogół optymalne działanie enzymów zachodzi w różnych warunkach. W ostatnich latach odkryto nową grupę enzymów działających w takich samych warunkach: jednakowe pH i temperatura działania, co umożliwia łatwiejsze konstruowanie automatów wielostanowych

opartych na enzymach restrykcyjnych. Konieczność stosowania pracochłonnych technik genetyki molekularnej stanowi jednak pewne ograniczenie w możliwości budowy nanomaszyn opartych o łańcuchy DNA. W pracy podano jednak metody, które umożliwią ponowne zastosowanie raz przygotowanych elementów automatu. Planowane są dalsze badania laboratoryjne w których zostanie sprawdzony wpływ na wyniki końcowe: długości słów, niedeterminizmu automatu, złożoności automatu, liczby użytych enzymów oraz ilości użytych związków chemicznych.

Dalsze badania nad automatem Shapiro wydają się obiecujące, szczególnie nad zastosowaniami np. w medycynie czy biotechnologii. Automat ten zbudowany jest wyłącznie ze związków organicznych, co w przyszłości predysponuje go do zastosowania wewnątrz organizmów żywych np. w celu diagnozowania chorób. Pierwszym krokiem w tym kierunku było zastosowanie idei automatu Shapiro do diagnozowania nowotworów, zaproponowane przez pomysłodawców automatu Shapiro (do tej pory tylko laboratoryjnie [4]). Pomysł zespołu z Instytutu Weizmanna polegał na identyfikacji i analizie obecności mRNA genów odpowiedzialnych za nabywanie przez komórki cech nowotworowych, a następnie ich wyciszeniu z użyciem siRNA. Wydaje się, że idea automatu Shapiro i jego rozszerzania może zostać wykorzystana również do konstrukcji biochipów (mikromacierzy) stosowanych do diagnostyki różnych chorób. Zastosowanie w technice, medycynie i nauce wymaga jednak długotrwałych i kosztownych badań laboratoryjnych, a następnie klinicznych.

7. Bibliografia

1. Adleman L.: Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science* 226, 1021-1024 (1994).
2. Benenson Y., Paz-Elizur T., Adar R., Keinan E., Livneh Z., Shapiro E.: *Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules*. *Nature* 414, 430-434 (2001).
3. Benenson Y., Adar R., Paz-Elizur T., Livneh Z., Shapiro E.: *DNA molecule provides a computing machine with both data and fuel*. *PNAS* 100, 2191-2196 (2003).
4. Benenson Y., Gil B., Ben-Dor U., Adar R., Shapiro E.: *An autonomous molecular computer for logical control of gene expression*. *Nature* 429, 423-429 (2004).
5. Bennett C.: *Logical reversibility of computation*. *IBM Journal of Research and Development* 17, 525-532 (1973).

6. Krasiński T., Sakowski S. : *Extended Shapiro Finite State Automaton*. Foundations of Computing and Decision Science 33, 241-255 (2008).
7. Rothmund P.: *A DNA and restriction enzyme implementation of Turing machines*. DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science 27. American Mathematical Society, 75-120 (1995).
8. Soreni M., Yogev S., Kossoy E., Shoham Y., Keinan E.: *Parallel biomolecular computation on surfaces with advanced finite automata*. Journal of the American Chemical Society 127, 3935-3943 (2005).
9. Węgrzyn S., Klamka J., Bugajski S., Gibas M., Winiarczyk R., Znamirowski L., Miszczak J., Nowak S.: *Nano i kwantowe systemy informatyki*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2004.
10. Unold O., Troć M., Dobosz T., Trusiewicz A.: *Extended molecular computing model*. WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine 1, 15-19 (2004).