**1Atlikimas:** 45 min.

**Laboratoriniai darbai, kuriuos reiktų atlikti prieš atliekant šį darbą:** BIOINF1.

**Vaistų parinkimas remiantis pacientų RNR mėginių sekomis**

**Teorinis įvadas**

Medicinos ateitis – personalizuotas gydymas. Taip vadinamas gydymo būdas, individualiai pritaikytas kiekvienam pacientui pagal jo genus ir baltymus. Šis metodas kol kas naudojamas tik pavieniais atvejais, tačiau visos tam reikalingos technologijos jau yra išrastos, taigi galime tikėtis, kad po 10-20 metų apsilankius klinikoje pirmiausia bus nustatomas jūsų genomas, o tik tada skiriami vaistai.

Šiame darbe turėsite skirti personalizuotą gydymą remdamiesi informacinės RNR molekulių sekomis. Žmogaus ląstelėms būdinga savybė, kad nuo vieno geno nurašomos kelios skirtingos RNR molekulės. Kiekvienas žmogaus genas turi intarpų, kurie nėra paverčiami RNR (pav. 1.). Šie intarpai vadinami intronais, o likusios, RNR koduojančios dalys – egzonais. Skirtingose ląstelėse (pvz., vėžinėse ir sveikose) RNR susidarymo metu gali būti pašalinti skirtingi egzonai, ir taip atsiranda skirtingi to paties geno iRNR variantai.



Pav. 1. Skirtingų RNR susidarymas iš vieno geno

Šiame darbe gausite tam tikro geno informacinės RNR sekas, gautas iš dviejų inkstų vėžiu sergančių pacientų mėginių. Naudodamiesi paieškos programa BLAST, turėsite nustatyti, nuo kokio geno šios RNR nurašytos. Tada palyginsite abu variantus su duomenų bazėje pateikta geno seka ir parinksite kiekvienam pacientui tinkamą gydymą.

**Tikslas**: identifikuoti tam tikro geno RNR variantus, aptiktus dviejuose pacientuose.

**Reikalingi failai**: rnr1.fasta, rnr2.fasta

**Eiga**

Failuose **rnr1.fasta, rnr2.fasta** pateiktos tam tikrų informacinių RNR iš dviejų pacientų sekos. Pirmiausia reikia nustatyti, nuo kokio geno šios RNR buvo nurašytos, o tam paieškosime šių sekų BLAST programa.

* Naršyklėje atsidarykite BLAST programos tinklapį (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Po antrašte „Basic BLAST“ rasite kelis BLAST programos variantus. Šiuo atveju atidarykite „nucleotide blast“, kadangi naudosime RNR, taigi nukleotidų, sekas.



Pav. 2. BLAST programos darbo laukas.

* Visą rnr1.fasta failo turinį nukopijuokite į laukelį A („Enter <...> FASTA sequences“) arba pasirinkite spustelėję ant „Choose File“ mygtuko.
* Laukelyje B reikia pasirinkti duomenų bazę, kurioje bus ieškoma – naudosime „Reference genomic sequences“, nes lyginsime RNR su žmogaus genomu.

K1. Iš kokių dviejų dalių susideda FASTA formato failai? (Jeigu nepamenate – apžiūrėkite turimą failą arba atsiverskite darbo BIOINF1 aprašą.)

|  |
| --- |
| 1) Duomenų aprašymas/komentarai  2) Užrašyta duomenų seka |

K2. Apžiūrėkite, kokias dar duombazes galima pasirinkti. Kai kurios iš jų vadinasi „genomic“, o kai kurios „genomic + transcript“. Kuo jos skiriasi?

|  |
| --- |
| Genomic - suatpimai ieškomi DNR duomenų bazėje  Genomic + transcript - sutapimai ieškomi DNR duomenų bazėje + transkribuotoje RNR(išreikštoje iš DNR) duomenų bazėje.  Taip pat galima pasirinkti žmogaus,pelės Genomic, Genomic + transcript duomenų bazes. |

* Kad apribotume paiešką tik žmogaus genuose, laukelyje C įrašykite „human“ arba „homo sapiens“.
* Galiausiai laukelyje D uždėkite varnelę, kad rezultatai būtų atverti naujame lange, ir spauskite mygtuką „BLAST“.

Paieška gali užtrukti keletą minučių – būkite kantrūs. Kol laukiate rezultatų, galite paleisti paiešką su failu rnr2.fasta, kaip aprašyta toliau.

* Grįžkite į pradinį BLAST langą su paieškos nustatymais, tik šįkart įterpkite antrojo failo turinį (arba pasirinkite jį su „Choose file“ mygtuku).
* Sutikrinkite, ar kiti nustatymai liko tokie pat, ir paleiskite paiešką. **Nesupainiokite langų su abiejų paieškų rezultatais!** Dabar grįžkite į langą, kur vyksta pirmoji paieška (arba jau pasirodė jos rezultatai).

Kai pasirodys rezultatai, lauke „Graphic Summary“ matysite keletą raudonų juostų – jos rodo, kad rastos sekos labai panašios į jūsų užklausą. Žemiau, lauke „Descriptions“, rasite ir sekų pavadinimus. Šįkart jos turėtų atrodyti taip:

Homo sapiens chromosome 12, hg19 Primary Assembly

Pav. 3. BLAST rezultato aprašo formatas. Pirma nurodytas organizmas, kuriam priklauso ši seka, po to sekos šaltinis (šiame pavyzdyje tai visa 12-os chromosomos seka, nustatyta „hg19“ projekte).

* Spustelkite ant pirmojo rezultato pavadinimo.

Matysite vaizdą, kur jūsų užklausa (eilutė „Query“) sulyginta su rasta seka (eilutė „Sbjct“). Vertikalūs brūkšniai tarp sekų rodo, kad toje vietoje abiejų sekų nukleotidai sutampa. Eilutėje „Features“ matysite, jei toje sekos srityje buvo nustatyta kokių nors genų. Sekos tikriausiai sutaps arti 100 % – vadinasi, paieška sėkmingai aptiko geną, kuris sutampa su jūsų turima RNR, ir beliko rasti jo pavadinimą.



Pav. 4. Tipiškas BLAST paieškos rezultatas.

K3. Kokio tipo molekulių sekos pateiktos rezultatuose – DNR ar RNR? Kaip tai nustatėte?

|  |
| --- |
| DNR, nes sekose yra timinas, nėra uracilo. |

* Pereikite prie grafinio rezultato vaizdo – paspauskite nuorodą „Graphics“ (pažymėta pav. 4). Atsidarys vaizdas, matomas pav. 5. Žalia juosta žymi geno padėtį chromosomoje, storos dalys – egzonus, plonos dalys – intronus. Vaizdą galite priartinti ar nutolinti spausdami -/+ ženklus arba slankikliu greta, o norėdami pajudinti vaizdą į šonus, tiesiog paspauskite ant tuščios vietos ir slinkite pelę.



Pav. 5. Grafinė rezultatų peržiūra. Matomas vienas egzonas (stora žalia juosta) ir dviejų intronų kraštai.

* Pavyzdyje matote, kad visas genas netelpa į naršyklės langą – panašu, kad plonos žalios juostelės (intronai) tęsiasi ir už jo ribų. Vaizdą tolinkite ir slinkite tol, kol į langą sutilps visas genas. (Jei nuklydote ir geno neberandate, tiesiog grįžkite į rezultatų langą ir atidarykite grafinį vaizdą iš naujo).
* Užvedę pelę ant geno juostos (žalia), matysite langelį su papildoma informacija. „Gene“ žymi geno santrumpą, o „Title“ – pilną pavadinimą.

K4. Geno santrumpą ir pavadinimą įrašykite žemiau – tai ir yra genas, nuo kurio buvo nurašyta jūsų RNR.

|  |
| --- |
| Gene: VEGFA  Title: vascular endothelial growth factor A |

K5. Suskaičiuokite, kiek egzonų (storos žalios juostelės) yra jūsų rastame gene.

|  |
| --- |
| Length: 16,279  9 egzonai |

K6. Dvi pilkos juostos grafinio vaizdo apačioje (galite remtis bet kuria iš jų) žymi, su kuriomis geno dalimis sutampa jūsų RNR. Kaip matote, geno juosta buvo ištisa, o čia sutampa tik pavieniai gabalėliai – intronai į RNR nepateko. Žemiau įrašykite, kurie egzonai pateko į jūsų turimą RNR seką, ir kurie – ne. Pirmą iš kairės geno egzoną žymėkite skaičiumi 1, sekantį – 2 ir t.t.

|  |  |
| --- | --- |
| Pateko:  1, 3, 4, 5, 7 | Nepateko:  2, 8 |

K7. Žinoma, kad šio geno RNR gali būti a ir b formų. Skirtumų ieškokite priartinę paskutinio egzono kairįjį kraštą: a formos RNR šio egzono pradžia normali, o b formos RNR dalis šio egzono prarasta – tokiu atveju atrodo, lyg RNR prasideda kiek toliau į dešinę, ne nuo pat egzono pradžios. Nustatykite, kokios formos buvo pateikta RNR.

|  |
| --- |
| b |

Pakartokite 8-10 žingsnius ir su antrosios paieškos rezultatais.

K8. Geno pavadinimą jau žinome, taigi belieka nustatyti, kurie egzonai pateko ar nepateko į antrojo varianto RNR, ir kokia jos forma (a ar b):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pateko:  1, 3, 4, 5, 6, 7 | Nepateko:  2, 8 | Forma:  a |

Galiausiai, grįžkime prie pagrindinės užduoties – parinkti kiekvienam pacientui tinkamus vaistus.

Jūsų tirtas genas valdo kraujagyslių augimą. Forma a koduoja baltymą, kuris skatina naujų kraujagyslių susidarymą, bet formos b koduojamas baltymas veikia priešingai – slopina. Vėžiniams augliams reikia maisto medžiagų, taigi augantis kraujagyslių tinklas jiems naudingas. Vaistas „Avastin“ (veiklioji medžiaga bevacizumabas) vienodai trukdo veikti abiejų formų baltymams, taigi kai kuriems pacientams jis padeda, o kai kuriems – kaip tik kenkia.

K9. Remdamiesi paciento Nr. 1 ir paciento Nr. 2 RNR formomis, kurias nustatėte šiame darbe, pažymėkite, kuriam pacientui (Nr. 1, Nr. 2, abiems ar nei vienam) skirtumėte vaistą „Avastin“. Paaiškinkite savo pasirinkimą.

|  |
| --- |
| 2 pacientui reikės vaisto "Avastin", nes jisai slopins a baltymus, neleis susiformuoti kraujagyslių tinklui, slopins vėžinį auglį. 1 ir taip nereikia |