

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja GOLOB

**UPORABA SINTETIČNIH DNA VEZAVNIH
PROTEINOV ZA IZVEDBO LOGIČNIH OPERACIJ V
BIOLOŠKIH SISTEMIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja biotehnologije

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja GOLOB

**UPORABA SINTETIČNIH DNA VEZAVNIH PROTEINOV ZA
IZVEDBO LOGIČNIH OPERACIJ V BIOLOŠKIH SISTEMIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja biotehnologije

**USING SYNTETIC DNA BINDING PROTEINS FOR REALIZATON
OF LOGICAL OPERATIONS IN BIOLOGICAL SYSTEMS**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil za mentorja imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja prof. dr. Roman Jerala in za recenzenta prof. dr. Simon Horvat.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Član: prof. dr. Roman Jerala
Kemijski inštitut, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Simon Horvat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 27. 8. 2013

Magistrska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje magistrske naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Anja Golob

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.2:60(043.2)=163.6
KG	sintezna biologija/efektorji TAL/sintetični transkripcijski faktorji/genska preklopna stikala
AV	GOLOB, Anja
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/JERALA, Roman (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	UPORABA SINTETIČNIH DNA VEZAVNIH PROTEINOV ZA IZVEDBO LOGIČNIH OPERACIJ V BIOLOŠKIH SISTEMIH
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XV, 75 str., 22 pregl., 41 sl., 10 pril., 124 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Sintezna biologija si na področju biološkega računalništva prizadeva graditi kompleksna gensko-regulatorna omrežja, za kar potrebujemo večje število ortogonalnih ter dobro okarakteriziranih transkripcijskih faktorjev. Večina do danes pripravljenih umetnih genskih stikal temelji na izoliranih in ovrednotenih naravnih bakterijskih transkripcijskih faktorjih, katerih število je omejeno, imajo različne biokemijske lastnosti, poleg tega pa lahko interagirajo z endogenimi celičnimi procesi. V magistrski nalogi smo se zato za pripravo genskega stikala odločili uporabiti sintetične transkripcijske faktorje na osnovi ortogonalnih DNA vezavnih domen efektorjev TAL, ki zaradi svoje modularne strukture omogočajo pripravo sintetičnih transkripcijskih faktorjev s poljubnim tarčnim vezavnim mestom, a s podobnimi biokemijskimi lastnostmi. Eksperimentalno smo dokazali, da so le-ti učinkoviti kot represorji ali aktivatorji. Z uporabo para represorjev TAL, ki nadzorujeta izražanje drug drugega, smo v celicah človeške linije HEK293T pripravili preklopno stikalo, ki je v elektronskih vezjih izvedeno kot dvoje med seboj povezanih logičnih vrat NOR. Kljub delovanju takšnih stikal na osnovi naravnih bakterijskih transkripcijskih faktorjev pa tak sistem z uporabo DNA vezavnih domen efektorjev TAL, zaradi nizke kooperativnosti le-teh, ni deloval. Preklopnemu stikalu z dvema represorjema smo zato dodali pozitivno povratno zanko na osnovi aktivatorjev TAL. Takšno izboljšano stikalo je v nasprotju s preklopnim stikalom z dvema represorjema ob prisotnosti kemijskega induktorja zavzelo stabilno stanje, ki ga je ohranilo tudi po odstranitvi induktorja. Hkrati smo dokazali, da je možen prekop med enim in drugim stanjem stikala. S tem smo pokazali, da efektorji TAL v sintezni biologiji predstavljajo osnovo za gradnjo bolj kompleksnih gensko-regulatornih omrežij. Takšna shema preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko pa bo omogočila izvedbo kompleksnih logičnih operacij in biološkega spomina v bioloških sistemih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 577.2:60(043.2)=163.6
CX synthetic biology/TAL effectors/sythetic transcription factors/genetic toggle switches
AU GOLOB, Anja
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/JERALA, Roman (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2013
TI USING SYNTETIC DNA BINDING PROTEINS FOR REALIZATON OF LOGICAL OPERATIONS IN BIOLOGICAL SYSTEMS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XV, 75 p., 22 tab., 41 fig., 10 ann., 124 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Synthetic biology strives to build complex gene-regulatory networks in the field of biological computing for which a large number of orthogonal and well characterized transcription factors is needed. To this day most of synthetic switches are based on isolated and characterized natural bacterial transcription factors, which are limited in number, have different biochemical properties and may interact with endogenous cell pathways. Therefore, for preparation of genetic switch, we decided to use synthetic transcription factors based on orthogonal DNA binding domains of TAL effectors. Their modular structure enables to prepare synthetic transcription factors with any desired target binding site but with similar biochemical properties. We experimentally demonstrated that they are effective as repressors as activators. We used a pair of TAL repressors, controlling each other's expression, to build a toggle switch in human HEK293T cell line. In electronic circuits, a toggle switch represents two interconnected NOR logic gates. Toggle switches based on natural bacterial transcription factors were shown to be functional, but despite of that, the system that was based on DNA binding domains of TAL effectors did not work, due to low cooperativity of TAL DNA binding domains. Therefore, we added a positive feedback loop based on TAL activators to the system. In contrast to the classical toggle switch, our improved switch was able to assume a steady stable state which remained stable even after the removal of a chemical inducer. We also demonstrated switching between states. This confirms that TAL effectors form the basis for building more complex gene-regulatory circuits in synthetic biology. Furthermore, such a scheme of toggle switch with positive feedback loop will enable the implementation of complex logic operations and biological memory in biological systems.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK.....	XV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 URAVNAVANJE TRANSKRIPCije	3
2.2 DNA VEZAVNI PROTEINI.....	3
2.2.1 Cinkovi prsti.....	4
2.2.2 Efektorji TAL	5
2.2.2.1 Zgodovina.....	5
2.2.2.2 Zgradba efektorjev TAL ter interakcija z DNA	6
2.3 TRANSKRIPCijski FAKTORJI V SINTEZNI BIOLOGIJI	9
2.3.1 Transkripcijski faktorji za sesalske celice na osnovi bakterijskih proteinov.....	9
2.3.2 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi ortogonalnih elementov	11
2.3.2.1 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi cinkovih prstov	12
2.3.2.2 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi efektorjev TAL	13
2.4 UMETNA GENSKO-REGULATORNA OMREŽJA	14
2.4.1 Dosedanji dosežki	15
2.4.1.1 Genska preklopna stikala	16
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Laboratorijska oprema	20
3.1.2 Kemikalije	21
3.1.3 Raztopine in pufri.....	22

3.1.4	Komercialni kompleti.....	23
3.1.5	Plazmidi	23
3.1.5.1	pcDNA3.0	23
3.1.5.2	pGL4.16.....	24
3.1.5.3	phRL-TK	25
3.1.6	Restriksijski encimi	25
3.1.7	Začetni oligonukleotidi.....	25
3.1.8	Organizmi.....	26
3.1.8.1	Bakterijski sevi.....	26
3.1.8.2	Celične kulture	27
3.1.9	Gojišča	27
3.2	METODE.....	27
3.2.1	Priprava gojišč	27
3.2.1.1	Gojišča za bakterije	27
3.2.1.2	Gojišča za celične kulture	28
3.2.2	Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin	28
3.2.3	Priprava genskih konstruktov z metodami molekularnega kloniranja .	28
3.2.3.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	28
3.2.3.2	Agarozna gelska elektroforeza	29
3.2.3.3	Čiščenje fragmentov DNA iz agaroznega gela	30
3.2.3.4	Lepljenje po Gibsonu	30
3.2.3.5	Restrikcija.....	32
3.2.3.6	Ligacija.....	32
3.2.3.7	Transformacija kompetentnih celic <i>E.coli</i>	33
3.2.3.8	Izolacija plazmidne DNA	33
3.2.3.9	Določanje koncentracije DNA	33
3.2.3.10	Določitev nukleotidnega zaporedja	33
3.2.3.11	Priprava trajnih kultur	33
3.2.4	Delo s celičnimi kulturami	34
3.2.4.1	Gojenje celic človeške linije HEK293T.....	34
3.2.4.2	Štetje in nacepljanje celic HEK293T v gojitvene plošče	34
3.2.4.3	Prehodna transfekcija celic HEK293T	34
3.2.4.4	Stimulacija celic HEK293T	35
3.2.5	Merjenje luciferazne aktivnosti.....	36
3.2.6	Konfokalna fluorescentna mikroskopija	36

4	REZULTATI.....	37
4.1	IZBIRA DNA VEZAVNIH DOMEN	37
4.2	PRIPRAVA IN TESTIRANJE TRANSKRIPCISKIH FAKTORJEV TAL	38
4.2.1	Priprava konstruktov	38
4.2.2	Učinkovitost in specifičnost represorjev TAL	39
4.2.3	Učinkovitost in specifičnost aktivatorjev TAL	41
4.3	PREKLOPNO STIKALO Z DVEMA REPRESORJEMA	42
4.3.1	Zasnova in delovanje stikala.....	42
4.3.2	Priprava konstruktov	43
4.3.3	Testiranje inducibilnih sistemov na osnovi represorjev TAL	45
4.3.4	Testiranje stikala s konfokalno mikroskopijo	46
4.4	PREKLOPNO STIKALO S POZITIVNO POVRATNO ZANKO	48
4.4.1	Zasnova in delovanje stikala.....	48
4.4.2	Priprava konstruktov	49
4.4.3	Tekmovanje med represorjem in aktivatorjem.....	51
4.4.4	Testiranje inducibilnih sistemov na osnovi aktivatorjev TAL	52
4.4.5	Testiranje stikala s konfokalno mikroskopijo	53
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	57
5.1	RAZPRAVA	57
5.1.1	Izbira DNA vezavnih domen	57
5.1.2	Učinkovitost in specifičnost vezave sintetičnih transkripcijskih faktorjev TAL.....	57
5.1.3	Preklopno stikalo z dvema represorjema.....	59
5.1.3.1	Inducibilni sistemi na osnovi represorjev TAL.....	59
5.1.3.2	Delovanje preklopnega stikala z dvema represorjema.....	59
5.1.4	Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko.....	60
5.1.4.1	Tekmovanje med represorjem in aktivatorjem.....	60
5.1.4.2	Inducibilni sistem na osnovi aktivatorjev TAL.....	61
5.1.4.3	Delovanje preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko.....	61
5.1.5	Uporaba genskih stikal.....	62
6	SKLEPI	63
7	POVZETEK (SUMMARY).....	64
7.1	POVZETEK.....	64
7.2	SUMMARY	64
8	VIRI	66

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekatere izmed molekul/signalov, ki se uporabljajo za indukcijo transkripcijskih faktorjev.....	9
Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem.....	20
Preglednica 3: Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem.....	21
Preglednica 4: Raztopine in pufri uporabljeni za pripravo DNA konstruktov.....	22
Preglednica 5: Raztopine in pufri uporabljeni za delo s celičnimi kulturami.	23
Preglednica 6: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti z navedbo proizvajalca.	23
Preglednica 7: Uporabljeni plazmidni vektorji.....	23
Preglednica 8: Uporabljeni restrikcijski encimi.	25
Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za verižno reakcijo s polimerazo.....	25
Preglednica 10: Uporabljeni bakterijski sevi <i>E. coli</i>	26
Preglednica 11: Uporabljene celične kulture.....	27
Preglednica 12: Sestava uporabljenih gojišč.	27
Preglednica 13: Sestava ene reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo AccuPrime™ Pfx.	28
Preglednica 14: Temperaturni in časovni profil verižne reakcije z DNA polimerazo AccuPrime™ Pfx.	28
Preglednica 15: Sestava ene reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo Phusion® High-Fidelity.	29
Preglednica 16: Temperaturni in časovni profil verižne reakcije z DNA polimerazo polimerazo Phusion® High-Fidelity.	29
Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu.	31
Preglednica 18: Priporočeno število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče (jetPEI™..., 2012).....	34
Preglednica 19: Redčitve induktorjev pristinamicina ter eritromicina.....	35
Preglednica 20: Restrikcijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.....	39
Preglednica 21: Restrikcijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala z dvema represorjema ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.....	45
Preglednica 22: Restrikcijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturno različne DNA vezavne domene (Xu in Morrical, 2010: 2).....	4
Slika 2: Struktura cinkovega prsta (Klug, 2010: 219).....	5
Slika 3: Struktura efektorja TAL AvrBs3 (Boch in sod., 2009: 1509).....	7
Slika 4: Preferenčnost posameznih RVD do določenih nukleotidov (Boch in sod., 2009: 1509).....	7
Slika 5: Struktura ene ponovitve efektorja TAL (Mak in sod., 2012).....	8
Slika 6: Kristalna struktura DNA vezavne domene efektorja TAL PthXo1 vezanega na tarčno DNA (Mak in sod., 2012).....	8
Slika 7: Represibilni sistem Pip _{OFF} in inducibilni sistem Pip _{ON} za uravnavanje genov v sesalskih celicah, katerih delovanje je odvisno od prisotnosti ali odsotnosti induktorja pristinamicina (PI) (Fussenegger in sod., 2000:1205).	10
Slika 8: Represibilni sistem E _{OFF} in inducibilni sistem E _{ON} za uravnavanje genov v sesalskih celicah, katerih delovanje je odvisno od prisotnosti ali odsotnosti induktorja eritromicina (EM) (Weber in sod., 2002: 902).	11
Slika 9: Ortogonalnost efektorjev TAL (Garg in sod., 2012: 2).....	13
Slika 10: Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi efektorjev TAL.	14
Slika 11: Hierarhija, ki prikazuje analogijo sintezne biologije in računalniškega inženirstva (Andrianantoandro in sod., 2006: 2).....	14
Slika 12: Shema elektronskega vezja sestavljenega iz dveh med seboj povezanih logičnih vrat NOR (Khalil in Collins, 2010: 368).....	16
Slika 13: Shema genskega stikala, ki za doseg bistabilnosti ne zahteva kooperativne vezave transkripcijskih faktorjev (Widder in sod., 2009: 2).	17
Slika 14: Gensko preklopno stikalo z dvema repesorjema z medsebojno inhibicijo (Gardner in sod., 2000: 339).....	17
Slika 15: Shemi ter dinamika izražanja reporterskega proteina SEAP pri dveh različnih epigenetskih preklopnih stikalih v sesalskih celicah (Greber in Fussenegger, 2007:337; Greber in sod., 2008: 13).....	19
Slika 16: Shema plazmidnega vektorja pcDNA3 (Invitrogen TM).....	24
Slika 17: Shema plazmidnega vektorja pGL4.16 (Promega).	24
Slika 18: Shema plazmidnega vektorja phRL-TK (Promega).....	25
Slika 19: Metoda lepljenja po Gibsonu..	31
Slika 20: Prehodna transfekcija celic HEK293T po protokolu proizvajalca jetPEI TM (jetPEI TM ..., 2012: 6).	35
Slika 21: Shema TALA ter TALB DNA vezavnih domen ter pripadajoča tarčna vezavna mesta, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi (Sander in sod., 2011).	37

Slika 22: DNA konstrukti, ki smo jih uporabili za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL.	38
Slika 23: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL.	39
Slika 24: Učinkovitost delovanja sintetičnih represorjev TALA oziroma TALB v odvisnosti od pozicije represorske domene KRAB v človeških celicah HEK293T..	40
Slika 25: Testiranje medsebojne ortogonalnosti represorjev TALA in TALB v človeških celicah HEK293T.	41
Slika 26: Učinkovitost delovanja aktivatorjev TALA in TALB ter testiranje medsebojne ortogonalnosti aktivatorjev TALA in TALB v človeških celicah HEK293T.	42
Slika 27: Preklopno stikalo z dvema represorjema.	43
Slika 28: DNA konstrukti za pripravo inducibilnih sistemov..	43
Slika 29: DNA konstrukti za preklopno stikalo z dvema represorjema.	44
Slika 30: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala z dvema represorjema.	44
Slika 31: Inhibicija izražanja poročevalskega gena fLuc z represorjem TALB oziroma TALA ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom v odvisnosti od količine inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB v človeških celicah HEK293T.	46
Slika 32: Spremljanje preklopnega stikala z dvema represorjema v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom	47
Slika 33: Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko, sestavljeno iz treh nivojev.	49
Slika 34: DNA konstrukti za preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko.	50
Slika 35: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko.	50
Slika 36: Represor TAL (desno) in aktivator TAL (levo) tekmujeta za skupno vezavno mesto, ki se nahaja pred izbranim genom (iGEM..., 2012b).	51
Slika 37: Tekmovanje za vezavna mesta med aktivatorjem in represorjem TAL v človeških celicah HEK293T..	52
Slika 38: Aktivacija izražanja poročevalskega gena fLuc z aktivatorjem TALA oziroma TALB ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom v odvisnosti od količine inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB.	53
Slika 39: Spremljanje preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom ob konstantno dodanem induktorju	54
Slika 40: Spremljanje preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom po odstranitvi induktorja.	55
Slika 41: Spremljanje preklopa preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom po zamenjavi induktorja..	56

KAZALO PRILOG

- Priloga A: DNA konstrukti uporabljeni v magistrski nalogi.
- Priloga B: Nukleotidna zaporedja posameznih segmentov, ki jih vsebujejo DNA konstrukti uporabljeni v magistrski nalogi.
- Priloga C: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju učinkovitosti represorjev TALA in TALB.
- Priloga D: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju specifičnosti vezave represorjev TALA in TALB.
- Priloga E: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju učinkovitosti in specifičnosti vezave aktivatorjev TALA in TALB.
- Priloga F: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju inducibilnih sistemov na osnovi represorjev TAL.
- Priloga G: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju inducibilnih sistemov na osnovi aktivatorjev TAL.
- Priloga H: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici pri testiranju preklopnega stikala z dvema represorjema.
- Priloga I: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter izmerjene povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti s pripadajočimi standardnimi odkloni pri testiranju tekmovanja med represorji TAL in aktivatorji TAL za vezavna mesta.
- Priloga J: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici pri testiranju preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (v/v)	volumski odstotek
% (w/v)	masno-volumski odstotek
∞	neskončno
BFP	modri fluorescentni protein (ang. blue fluorescent protein)
bp	bazni par
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
efektorji TAL	transkripcijskim aktivatorjem podobni efektorji (ang. transcription activator-like effector)
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
fLuc	kresničkina luciferaza (ang. firefly luciferase)
fLuc-pufer	pufer za merjenje aktivnosti kresničkine luciferaze
HEK293T	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line) z vstavljenim SV40 T antigenom
kbp	kilobazni par
KRAB	represorska domena na osnovi KRAB (ang. Kruppel-associated box)
LB	gojišče Luria-Bertani
MQ	milli-Q voda (dodatno očiščena deionizirana voda)
NLS	jedrni lokalizacijski signal (angl. nuclear localization signal)
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphate buffer saline)
pCMV	konstitutivni promotor
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
pMIN	minimalni promotor
Renilla-pufer	pufer za merjenje aktivnosti <i>Renilla</i> luciferaze
RLE	relativne luciferazne enote

rLuc	<i>Renilla</i> luciferaza
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	obrati na minuto (ang. revolutions per minute)
RVD	ostanek, ki variira s ponovitvijo (ang. repeat variable diresidue)
SEAP	človeška sekrecijska alkalna fosfataza (ang. human placental-secreted alkaline phosphatase)
SV40	simian virus 40
T _m	talilna temperatura (ang. melting temperature)
VP16	aktivatorska domena herpes simpleks virusnega proteina 16 (ang. virion protein 16)

SLOVARČEK

Aktivatorska domena VP16	Domena na N-terminalnem koncu herpes simpleks virusnega proteina 16 (VP16; ang. virion protein 16), ki sodeluje pri tvorbi transkripcijskega kompleksa in sproži aktivacijo transkripcije tarčnega gena (Hall in Struhl, 2002; Wysocka in Herr, 2003).
DNA vezavna domena	Del DNA vezavnega proteina, ki je odgovoren za vezavo na specifično ali nespecifično tarčno nukleotidno zaporedje.
Efektorji TAL	Transkripcijski faktorji fitopatogenih bakterij rodu <i>Xanthomonas</i> . Njihova DNA vezavna domena je običajno sestavljena iz približno 17 ponovitev dolžine 34 aminokislin, ki se razlikujejo le v aminokislinah na poziciji 12 in 13. Ti variabilni aminokislinski, angleško imenovani »repeat variable diresidue« (RVD; ostanek, ki variira s ponovitvijo), sta ključni za specifično vezavo efektorjev TAL na DNA (Boch in Bonas, 2010).
Fuzijski protein	Fuzijske ali himerne proteine se pripravi s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA, in sicer z združevanjem dveh ali več genov, ki kodirajo posamezne proteine ali domene proteinov. Po translaciji takšnega fuzijskega proteina nastane ena sama funkcionalna polipeptidna veriga.
Kooperativnost	Lastnost proteinov z večjim številom vezavnih mest, kjer se z vezavo liganda na vezavno mesto afiniteta liganda do vezavnih mest povečuje (pozitivna kooperativnost) ali zmanjšuje (negativna kooperativnost).
Modularnost	Lastnost sistema ali komponent, ki dovoljuje, da se različne neodvisne podenote lahko ločijo ter nato ponovno združijo v različnih možnih kombinacijah.
Ortogonalnost	Koncept ortogonalnosti oziroma neodvisnosti je sintezna biologija povzela iz računalniških znanosti. To je lastnost, ki omogoča, da komponente sistema delujejo neodvisno ena od druge.
Represorska domena KRAB	N-terminalna domena KRAB (ang. Kruppel-associated box) je del nekaterih evkariontskih cinkovih prstov, ki povzroči inhibicijo transkripcije tarčnega gena (Gebelein in Urrutia, 2001).
Nelinearnost	Obnašanje gensko-regulatornega omrežja, kjer se moč izhodnega signala ne spreminja sorazmerno z močjo vhodnega signala.

1 UVOD

Sintezna biologija je nova interdisciplinarna veda, ki združuje znanja biologije, kemije, inženirstva in je neke vrste nadgradnja genskega inženiringa. Njeni začetki segajo v sredino 20. stoletja, ko sta Watson in Crick (1953) razvozlala strukturo deoksiribonukleinske kisline (DNA). Sedemdeseta leta je pomembno zaznamovalo odkritje restrikcijskih endonukleaz, kar je vodilo v razvoj tehnologije rekombinantne DNA. Pričel se je hiter vzpon sintezne biologije, katere cilj je ustvarjati nove biološke sisteme ali spreminjati v naravi že obstoječe, z uporabo standardnih bioloških gradbenih enot. Bistveni principi, ki jih sintezna biologija privzema iz inženirskih znanosti so: standardizacija, abstrakcija, modeliranje, ortogonalnost in modularnost (Panke, 2008). Ribonukleinska kislina (RNA), DNA, proteini in metaboliti (lipidi, ogljikovi hidrati, aminokisline in nukleotidi) so za sinteznega biologa to, kar za računalniškega inženirja predstavljajo fizične plasti tranzistorjev, kondenzatorjev in uporov. Celotna analogija se stopnjuje navzgor po hierarhični lestvici (Andrianantoandro in sod., 2009). Za sintezno biologijo je ključnega pomena standardizacija, saj ta omogoča enostavno sestavljanje genetskih komponent (geni, promotorji, ribosomska vezavna mesta...) v biološke naprave (pretvorniki, ojačevalci) ter nadaljnje sestavljanje naprav v kompleksnejše sisteme, kot so preklopna stikala, logična vrata in oscilatorji (Andrianantoandro in sod., 2009).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Z uspešno realizacijo prvih umetnih genskih mrež, kot sta gensko preklopno stikalo (Gardner in sod., 2000) in represilator (Elowitz in Leibler, 2000), se je pokazalo, da sintezna biologija v sožitju z inženirskimi znanostmi lahko načrtuje in gradi izredno prefinjene gensko-regulatorne mreže, ki so v svoji kompleksnosti primerljive mrežam v računalnikih. Vendar za pripravo kompleksnih logičnih funkcij v sesalskih celicah, omejeno število sicer učinkovitih, naravnih prokariontskih transkripcijskih faktorjev, ne zadostuje. Hkrati so le-ti nestandardizirani in zaradi svoje naravne biološke funkcije lahko interagirajo tudi z ostalimi molekulami. Za pripravo kompleksnih gensko-regulatornih mrež oziroma za povezovanje le-teh v večja genska omrežja, potrebujemo večje število standardiziranih ter ortogonalnih transkripcijskih faktorjev, ki delujejo neodvisno od endogenega celičnega okolja. Na tem področju je veliko obetala tehnologija cinkovih prstov, a se je izkazalo, da je načrtovanje le-teh dolgotrajno in še vedno precej drago. Alternativa so pred kratkim odkriti efektorji TAL (ang. transcription activator-like), ki so po svoji modularni strukturi in ortogonalnosti precej podobni cinkovim prstom.

1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA

Cilj magistrskega dela je priprava epigenetskega bistabilnega stikala na osnovi sintetičnih transkripcijskih faktorjev sestavljenih iz DNA vezavne domene efektorjev TAL ter efektorske (represorske oziroma aktivatorske) domene. Do sedaj gensko stikalo na osnovi standardiziranih, ortogonalnih elementov eksperimentalno še ni bilo pripravljeno. Takšno

stikalo bi bila lahko osnova za pripravo številnih bistabilnih ali multistabilnih preklopnih stikal ter kompleksnejših gensko-regulatornih omrežij, kot so na primer oscilatorji, v sesalskih celicah.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo s fuzijo DNA vezavnih domen efektorjev TAL z aktivatorsko domeno VP16 ali represorsko domeno KRAB, lahko pripravili sintetične transkripcijske faktorje. Predvidevamo, da bodo le-ti učinkovito in specifično sprožili oziroma zavrli transkripcijo tarčnega poročevalskega gena. V sesalskih celicah bomo s sintetičnimi transkripcijski faktorji pod kontrolo predhodno optimiziranih inducibilnih sistemov (Pip_{ON} in E_{ON}) pripravili epigenetsko bistabilno stikalo. Predvidevamo, da bomo z dvema različnima zunanjima signaloma lahko inducirali eno ali drugo stanje stikala ter da bo stikalo tudi po odstranitvi induktorja ohranilo stabilno stanje. Predpostavljamo, da bo stikalo z zunanjimi signali možno preklopiti iz enega v drugo stanje.

2 PREGLED OBJAV

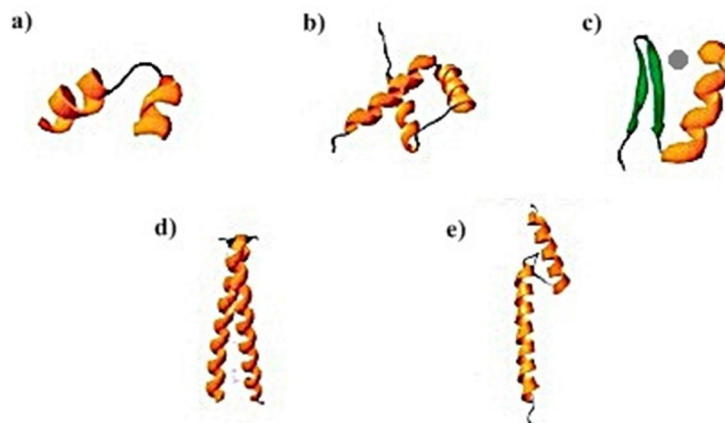
2.1 URAVNAVANJE TRANSKRIPCije

Kljub temu, da vse celice v človeškem telesu nosijo enak genetski zapis, se celice različnih tkiv fenotipsko med seboj zelo razlikujejo. To je posledica natančnega genskega uravnavanja na nivoju transkripcije in translacije, zaradi česar se v posamezni celici izraža le majhen delež vseh genov, ki kodirajo proteine ali nekodirajoče RNA odgovorne za izvajanje različnih celičnih funkcij. Transkripcija je prvi korak pri prenosu informacij od gena do proteina. Pri tem sodeluje protein polimeraza RNA, ki je odgovorna za prepis določenih segmentov DNA v RNA. Uravnavanje transkripcije v osnovi temelji na notranjih ali zunanjih signalih, ki povzročijo vezavo regulatornih elementov na specifično DNA vezavno mesto pred kodirajočo regijo proteina. Ti regulatorni elementi neposredno ali posredno pripomorejo k vezavi polimeraze RNA na začetno mesto prepisovanja (promotor) in s tem sprožijo transkripcijo ali preprečijo vezavo polimeraze RNA na promotor, kar vodi v inhibicijo transkripcije (Griffiths in sod., 2008). Transkripcijski faktorji igrajo ključno vlogo pri uravnavanju izražanja genov in običajno vsebujejo domeno odgovorno za vezavo na tarčno DNA (DNA vezavna domena) ter domeno z neko regulatorno funkcijo (efektorska domena), kar sta odkrila že Brent in Ptashne (1985).

2.2 DNA VEZAVNI PROTEINI

DNA vezavni proteini so vključeni v vrsto bioloških procesov, od uravnavanja transkripcije in podvajanja do pakiranja, popravljanja ter reorganizacije DNA. Vsebujejo eno ali več DNA vezavnih domen, ki se lahko popolnoma neodvisno zvihejo v pravilno proteinsko strukturo in so odgovorne tako za specifično kot za nespecifično vezavo na dvo- ali eno-verižno DNA. Ena izmed največjih in najbolj raznolikih skupin DNA vezavnih proteinov so zagotovo transkripcijski faktorji, katerih naloga je natančno uravnavanje različnih celičnih procesov. Poznamo več strukturno različnih DNA vezavnih domen, kot so vijačnica-zavoj-vijačnica, cinkovi prsti, levcinska zadruga, vijačnica-zanka-vijačnica,... (Pabo in Sauer, 1992) (Slika 1). Motiv vijačnica-zavoj-vijačnica (Slika 1a) je eden izmed najbolj pogostih motivov DNA vezavnih proteinov, ki ga najdemo tako v prokariontih kot v evkariontih. Sestavlja ga približno dvajset aminokislin, ki tvorijo dve vijačnici alfa med katerima je kratek zavoj iz štirih aminokislin. Z velikim žlebom DNA specifično interagira le ena izmed vijačnic. Proteini z motivom vijačnica-zavoj-vijačnica v prokariontih običajno delujejo kot dimeri in prepoznavajo palindromske sekvence DNA. Motiv vijačnica-zavoj-vijačnica v evkariontih, imenovan homeodomena, se nekoliko razlikuje od motiva v prokariontih. Homeodomeno sestavljajo tri vijačnice alfa, med katerimi sta dve vijačnici podobni motivu vijačnica-zavoj-vijačnica (Slika 2b). V nasprotju s prokariontskim motivom vijačnica-zavoj-vijačnica, se homeodomena na DNA veže kot monomer (Xu in Morrical, 2010). Motiv cinkovih prstov (podrobneje opisano v poglavju 2.2.1) sestavljata antiparalelni plošči beta ter vijačnica alfa, z osrednjim cinkovim ionom (Slika 1c). Motiv levcinske zadrge (Slika 1d) je bil prvič odkrit kot del evkariontskih transkripcijskih faktorjev (Landschulz in sod., 1988). Sestavljen je iz 30-40 aminokislin, ki tvorijo dve paralelni vijačnici alfa, na vsakih sedem aminokislin pa se pojavi aminokislina levcin. En zavoj vijačnice alfa je dolg 3,6 aminokislina, tako da se levcin pojavi na

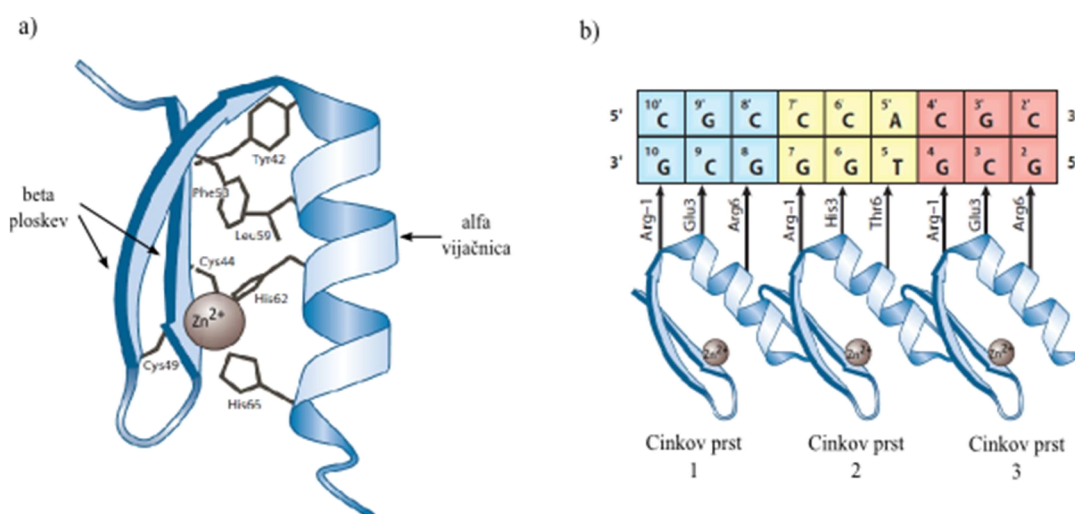
približno dva zavoja in vedno na enaki strani vijačnice. Proteini z motivom vijačnica-zanka-vijačnica so transkripcijski aktivatorji, ki se v raztopini nahajajo v dimerni obliki, prav tako pa kot dimeri interagirajo z DNA. Motiv vijačnica-zanka-vijačnica (Slika 1e) je sestavljen iz dveh vijačnic alfa, ki ju povezuje zanka različnih dolžin, od 5 do 24 aminokislin (Xu in Morrical, 2010).



Slika 1: Strukturno različne DNA vezavne domene. (a) Motiv vijačnica-zavoj-vijačnica, (b) homeodomena, (c) motiv cinkovih prstov, (d) motiv levčinske zadrge, (e) motiv vijačnica-zanka-vijačnica (Xu in Morrical, 2010: 2).

2.2.1 Cinkovi prsti

Miller in sod. (1985) so preučevali transkripcijski faktor IIIA afriške žabe *Xenopus laevis* in v njegovi strukturi odkrili ponavljajoči motiv (devet tandemskih ponovitev približno tridesetih aminokislin), ki so ga zaradi vsebnosti cinka ter načina vezave na DNA, poimenovali kar cinkovi prsti. Do danes je poznanih že več poddružin cinkovih prstov, ki se poleg na DNA lahko vežejo tudi na RNA ali proteine in se med seboj razlikujejo po funkciji, strukturi in aminokislinski sestavi (Laity in sod., 2001). Med najbolj razširjene DNA vezavne domene v evkariontih spadajo cinkovi prsti Cys₂His₂, ki vsebujejo antiparalelni plošči beta ter vijačnico alfa (Lee in sod., 1989), za pravilno zvitje pa potrebujejo cinkov ion (Frankel in sod., 1987) (Slika 2a). Aminokislinski ostanki vijačnice alfa cinkovega prsta specifično interagirajo s tremi baznimi pari v velikem žlebu dvojne vijačnice DNA preko vodikovih vezi ter hidrofobnih interakcij (Pavletich in Pabo, 1991) (Slika 2b).



Slika 2: Struktura cinkovega prsta. (a) Vsak cinkov prst veže en cinkov ion (Zn^{2+}), za vezavo katerega sta pomembna dva cisteinska ostanka na ploskvi beta ter dva histidinska ostanka na vijačnici alfa. (b) Shematski prikaz vezave DNA vezavne domene (sestavljena iz treh cinkovih prstov) transkripcijskega faktorja Zif268 na DNA. Vsak cinkov prst specifično prepozna tri bazne pare z aminokislinskimi ostanki vijačnice alfa, ki so na pozicijah -1, +3 in +6 (Klug, 2010: 219).

2.2.2 Efektorji TAL

Pred kratkim so odkrili nove DNA vezavne proteine, imenovane transkripcijskim aktivatorjem podobni (TAL; ang. transcription activator-like) efektorji. Ti proteini imajo povsem drugačno zgradbo in način vezave na DNA kot do tedaj poznani motivi DNA vezavnih proteinov.

Efektorji TAL so transkripcijski faktorji fitopatogenih bakterij rodu *Xanthomonas*, ki preko bakterijske sekrecijske poti tipa III vstopijo v rastlinske celice, se transportirajo v celično jedro ter z vezavo na promotorje tarčnih genov aktivirajo transkripcijo rastlinskih genov (Boch in Bonas, 2010). Ti aktivirani rastlinski geni inhibirajo rastlinski obrambni sistem in pripomorejo k kolonizaciji ter razširjanju bakterij (Yang in sod., 2006) ali pa v rastlinah, ki so uspešno razvile odpornost, aktivirajo rastlinski obrambni sistem (Gu in sod., 2005). Za izvedbo magistrske naloge smo uporabili efektorje TAL, zato se bomo v nadaljevanju osredotočili nanje.

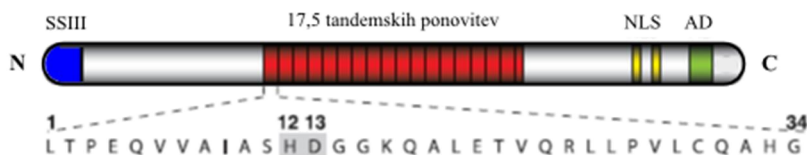
2.2.2.1 Zgodovina

Prvi efektor TAL AvrBs3 so Bonas in sod. (1989) odkrili v poprovem in paradižnikovem patogenu *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. V sortah popra, ki vsebujejo gen za rezistenco *Bs3*, AvrBs3 aktivira rastlinski imunski odziv. V nukleotidnem zaporedju gena *avrBs3* so našli 17 ponovitev, vsaka dolžine 34 aminokislin, vendar takrat še niso vedeli, da so te ponovitve ključne za vezavo efektorjev TAL na DNA (Bonas in sod., 1989). Kmalu za tem so v riževem patogenu *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* identificirali tri avirulenčne gene (*avrXa5*, *avrXa7*, *avrXa10*) homologne *avrBs3*, ki so bili v primerjavi z *avrBs3* visoko ohranjeni in so vsebovali podobne tandemske ponovitve. Primerjava teh ponovitev med AvrBs3 ter AvrXa10 je razkrila, da do razlik v ponovitvah v večini prihaja

v variabilni regiji, ki jo predstavljata aminokislini na pozicijah 12 ter 13, medtem ko sta C-ter N- terminalna regija visoko ohranjeni (Hopkins in sod., 1993). O pomenu ponovitev za specifično vezavo efektorjev TAL na DNA so prvič poročali Herbers in sod. (1992), ki so želeli ugotoviti, ali je za aktivacijo rastlinskega imunskega odziva potrebnih vseh 17,5 kopij ponovitev AvrBs3. Z delekcijo različnih ponovitev so dokazali, da večina mutant izgubi svojo aktivnost, nekatere pa pridobijo povsem novo specifičnost. S tem so pokazali, da so ponovitve tiste, ki določajo specifičnost vezave AvrBs3 na DNA. Odkrili so, da poleg DNA vezavne domene, efektorji TAL na N-terminalnem koncu vsebujejo sekrecijski signal tipa III, na C-terminalnem koncu pa aktivacijsko domeno (Zhu in sod., 1998) ter jedrni lokalizacijski signal (NLS; angl. nuclear localization signal), ki je dogovoren za transport efektorjev TAL v jedro (Yang in Gabriel, 1995; Van den Ackerveken in sod., 1996) (Slika 3). Odkritje, da efektorji TAL vsebujejo zaporedje NLS ter aktivacijsko domeno je bilo zanimivo, ker sta to evkariontska motiva, kar je nakazovalo na aktivnost AvrBs3 v rastlinskih celicah. Leta 2007 sta dve skupini raziskovalcev objavili prvo znano vezavno mesto na katero se veže efektor TAL AvrBs3, imenovano zaporedje UPT (ang. upregulated by AvrBs3 box) (Kay in sod., 2007; Römer in sod., 2007). Ponovitvena domena v efektorjih TAL je takrat predstavljala novo DNA vezavno domeno, ki je bila povsem drugačna od takrat že poznanih DNA vezavnih domen, zato je določitev aminokislin vključenih v prepoznavo baznih parov predstavljalo velik izziv. Preboj se je zgodil v letu 2009, ko so v dveh neodvisnih študijah, z uporabo eksperimentalnega (Boch in sod., 2009) in računalniškega pristopa (Moscou in Bogdanove, 2009), dešifrirali kodo za prepoznavo DNA. Odkritje kode za prepoznavo DNA je bila odločilna odskočna deska za efektorje TAL, ki kažejo izjemen potencial kot molekularno orodje. Od takrat so načrtovali številne umetne DNA vezavne domene TAL spojene z endonukleazo *FokI*, s čimer so uspešno modificirali tarčne gene v kvasovkah (Christian in sod., 2010; Li in sod., 2010), glistah (Wood in sod., 2011), ribah cebricah (Huang in sod., 2011; Sander in sod., 2011) ter v človeških pluripotentnih celicah (Hockemeyer in sod., 2011). Sung in sod. (2013) je na ta način uspelo ustvariti miške z izbitim genom. Mercer in sod. (2012) so z efektorji TAL pripravili himerne rekombinaze. Ideja je podobna kot pri cinkovih prstih, le da so DNA vezavno domeno cinkovih prstov zamenjale DNA vezavne domene TAL.

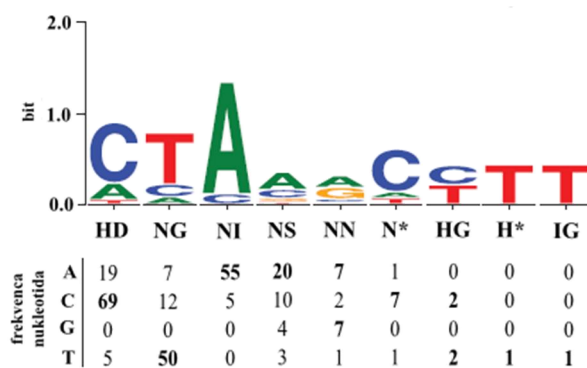
2.2.2.2 Zgradba efektorjev TAL ter interakcija z DNA

Med 113 efektorji TAL iz *Xanthomonas* so odkrili, da se število ponovitev v efektorjih TAL giblje med 1'5 do 33'5, najpogosteje pa efektorji TAL vsebujejo 17'5 ponovitev (Boch in Bonas, 2010). Geni za efektorje TAL z manj ponovitvami so najverjetneje nefunkcionalni, saj so Boch in sod. (2009) dokazali, da je za aktivacijo gena potrebnih vsaj 6'5 ponovitev, 10'5 ali več ponovitev pa vodi v močno aktivacijo reporterskega gena. Skoraj vse ponovitve so dolge 34 aminokislin in se med seboj razlikujejo v aminokislinah na poziciji 12 ter 13 (Slika 3). Ta par hipervariabilnih aminokislin, imenovan ostanek, ki variira s ponovitvijo (RVD; ang. repeat variable diresidue), določa specifičnost vezave na nukleotid. Pred prvo ponovitvijo se nahaja še ničta ponovitev, ki veže timidin in je pomembna za vezavo efektorja TAL na tarčno DNA, kljub temu, da ima aminokislinsko sestavo precej drugačno od ostalih ponovitev. Zadnja ponovitev je vedno tako imenovana polovična ponovitev, ki je nekoliko okrnjena, saj vsebuje le prvih 20 aminokislin ponovitve, vključno z RVD (Boch in Bonas., 2010).



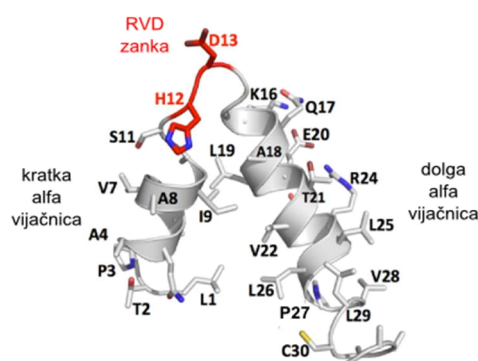
Slika 3: Struktura efektorja TAL AvrBs3. N-terminalna regija vsebuje sekrecijski signal tipa III (SSIII), C-terminalna regija pa jedrni lokalizacijski signal (NLS) ter aktivacijsko domeno (AD), zaradi česar efektorji TAL v rastlinskih celicah delujejo kot transkripcijski aktivatorji. Vsaka izmed ponovitev, razen zadnja polovična ponovitev, kodira 34 aminokislin. Aminokislinska sekvence prikazuje prvo ponovitev AvrBs3, kjer je s sivo obarvan RVD oziroma hipervariabilni aminokislini na pozicijah 12 in 13 (Boch in sod., 2009: 1509).

Med do danes poznanimi efektorji TAL so našli okoli dvajset različnih RVD-jev, med katerimi se štirje najpogostejše pojavljajo – HD (His-Asp), NG (Asn-Gly), NN (Asn-Asn), NI (Asn-Ile). Vsak izmed njih preferenčno interagira z enim izmed štirih nukleotidov (Slika 4). HD se preferenčno veže za citozin, NG na timidin ter NI na adenin. NN se veže tako na adenin kot tudi na gvanin, s preferenco do gvanina, medtem ko je NS neselektiven RVD, saj lahko veže vse štiri nukleotide (Boch in sod., 2009).



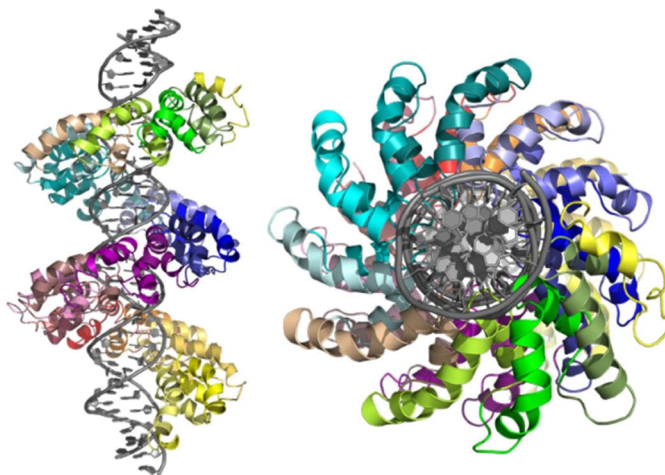
Slika 4: Preferenčnost posameznih RVD do določenih nukleotidov (zaradi lažjega prikaza, so prikazani le nukleotidi kodirajoče DNA). Zvezdica (*) pomeni, da v ponovitvi manjka aminokislina na poziciji 13. Najvišje frekvence nukleotida so napisane s krepkim tiskom (Boch in sod., 2009: 1509).

V letu 2012 sta bili izvedeni dve študiji strukture efektorjev TAL. V prvi so določili kristalno strukturo umetno načrtovanemu efektorju TAL dHAX3, ki je vseboval 11,5 ponovitev s tremi najbolj zastopanimi RVD-ji (HD, NG in NS). Strukturo so določili tako prostemu dHAX3 kot tudi dHAX3 vezanemu na dvojno vijačnico (Deng in sod., 2012). V drugi študiji so kristalno strukturo določili naravnemu efektorju TAL PthXo1 iz *Xanthomonas oryzae*. Kljub temu, da so strukturo določili le PthXo1 vezanemu na dvojno vijačnico in pri precej nižji resoluciji, je PthXo1 vseboval kar 23,5 ponovitev med katerimi je bilo zastopanih šest različnih RVD-jev (HD, NG, HG, NN, Ni in N*) (Mak in sod., 2012). Obe študiji sta pokazali, da imajo vse posamezne ponovitve TAL približno enako konformacijo in sicer, da vsako ponovitev sestavljata ena kratka ter ena dolga vijačnica alfa, ki sta med seboj povezani s kratko RVD zanko, katere del sta aminokislini na poziciji 12 ter 13 (Slika 5).



Slika 5: Struktura ene ponovitve efektorja TAL. Vse ponovitve efektorjev TAL imajo skoraj identično strukturo. Vsaka ponovitev vsebuje kratko in dolgo vijačnico alfa, ki ju povezuje kratka RVD zanka (Mak in sod., 2012).

Vse ponovitve skupaj tvorijo desno-sučno super-vijačnico, ki se ovije okoli velikega žlebu dvojne vijačnice, vzdolž celotne tarčne DNA (Slika 6). Prosta struktura dHAX3 ima bolj raztegnjeno in rahlo odvrto konformacijo v primerjavi z dHAX3 vezanim na dvojno vijačnico, kljub temu pa ima protein še vedno konformacijo desno-sučne super-vijačnice, le RVD-ji sosednjih ponovitev so nekoliko bolj oddaljeni drug od drugega (Deng in sod., 2012).



Slika 6: Kristalna struktura DNA vezavne domene efektorja TAL PthXo1 vezanega na tarčno DNA (na sliki levo pogled od strani in na sliki desno pogled vzdolž osi DNA). Prikazanih je vseh 22,5 ponovitev efektorja TAL PthXo1 (vsaka je obarvana z drugačno barvo) (Mak in sod., 2012).

Obe kristalni strukturi sta pokazali, da je za specifični kontakt efektorja TAL z DNA pomembna izključno druga aminokislina RVD-ja, torej aminokislina na poziciji 13, kako le-ta interagira z določenim nukleotidom pa je odvisno od same aminokisline (Mak in sod., 2012). Prva aminokislina RVD-ja na poziciji 12 (običajno asparagin ali histidin) ima le strukturno vlogo in ne interagira direktno z DNA, ampak tvori vodikovo vez s karbonylnim kisikom aminokisline na poziciji 8, ki se nahaja na C-terminalnem koncu prve vijačnice alfa efektorja TAL. S tem se stabilizira konformacija RVD zanke, ki je ključna za specifično prepoznavo DNA (Deng in sod., 2012; Mak in sod., 2012).

2.3 TRANSKRIPCijski FAKTORJI V SINTEZNI BIOLOGIJI

Pri kompleksnih gensko-regulatornih omrežjih je potrebna natančna in predvidljiva regulacija procesov kot so transkripcija, translacija in proteoliza. Uravnavanje genov v organizmih se odvija s pomočjo regulatornih mehanizmov, ki imajo sposobnost zaznavanja tako notranjih kot zunanjih signalov. Po tem vzoru so v preteklih letih pri gradnji umetnih gensko-regulatornih mrež v sesalskih celicah uporabljali heterologne transkripcijske regulatorne elemente. Običajno se za te namene izkoriščajo bakterijski regulatorni elementi, ki imajo sposobnost specifične vezave na promotorska zaporedja ter posledično inhibicije ali aktivacije tarčnega gena. Vezava teh regulatornih elementov na tarčna vezavna mesta je pogosto odvisna od prisotnosti ali odsotnosti induktorja, ki povzroči asociacijo oziroma disociacijo regulatornega elementa z vezavnim mestom.

2.3.1 Transkripcijski faktorji za sesalske celice na osnovi bakterijskih proteinov

Prvi sintetični transkripcijski faktor za sesalske celice so pripravili s fuzijo represorskega proteina TetR iz *E.coli* in aktivatorske domene iz herpes simpleks virusnega proteina 16 (VP16; ang. viron protein 16). Ta hibridni transaktivatorski protein je z vezavo na tetraciklinski operator (*tetO*) aktiviral izražanje reporterskega gena pod kontrolo minimalnega promotorja v sesalskih celicah HeLa, kljub temu, da so ključni regulatorni elementi izhajali iz *E.coli* (Gossen in Bujard, 1992). Znanstveniki so do danes precej povečali repertoar sintetičnih transkripcijskih faktorjev na osnovi bakterijskih proteinov, ki jih je moč uravnavati z različnimi ligandi, kot so antibiotiki in drugi metaboliti (Ausländer in Fussenegger, 2013).

Za nadzorovano izražanje heterolognih genov so do danes razvili že vrsto inducibilnih transkripcijskih faktorjev. Prvi so temeljili na bakterijskih regulatornih elementih, ki jih je možno inducirati z antibiotiki, kot so tetraciklin (Gossen in Bujard, 1992), streptogramini (Fussenegger in sod., 2000), makrolidi (Weber in sod., 2002) in kumermicin/novobiocin (Zhao in sod., 2003). Vendar antibiotiki zaradi različnih stranskih učinkov in pojava rezistence niso najbolj primerni za uporabo v terapevtskih aplikacijah (Kapunisk-Uner in sod., 1996; Wegener in sod., 1997; Sanchez in sod., 2004; Alanis, 2005), kar je vodilo v razvoj inducibilnih transkripcijskih faktorjev, ki se odzivajo na majhne induktorje, kot so signalne molekule, razni metaboliti, hormoni, itd. (Preglednica 1) (Ausländer in Fussenegger, 2013). Tehnologija uravnavanja transkripcije heterolognih genov v sesalskih celicah ter tkivih z uporabo klinično odobrenih majhnih molekul je močno orodje za vrsto različnih aplikacij.

Preglednica 1: Nekatere izmed molekul/signalov, ki se uporabljajo za indukcijo transkripcijskih faktorjev.

Induktorska molekula/signal	Referenca
butirolaktoni (molekule odgovorne za zaznavanje celične gostote)	Weber in sod., 2003
rapamicin (imunosupresivna molekula)	Rivera in sod., 1996
estrogen (hormon)	Brasemann in sod., 1993
L-arginin (aminokislina)	Hartenbach in sod., 2007

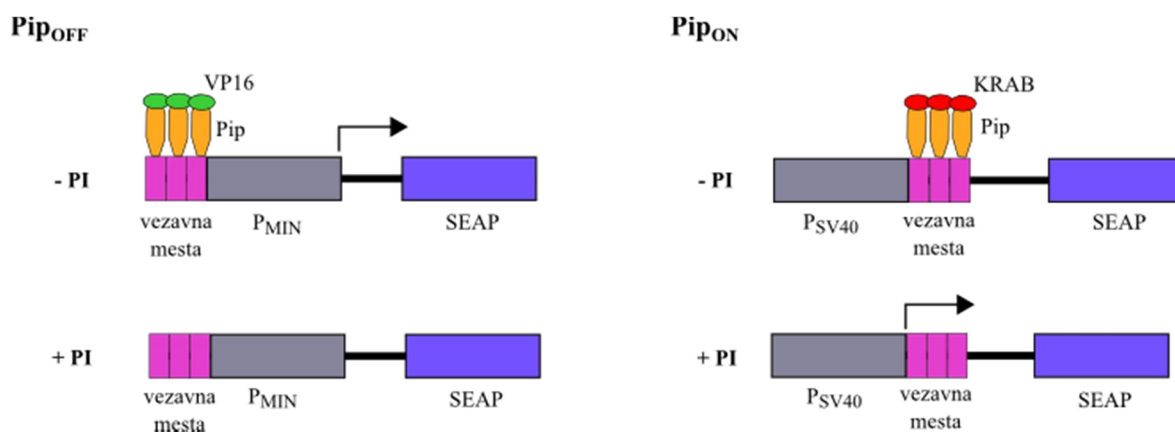
Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 1. Nekatere izmed molekul/signalov, ki se uporabljajo za indukcijo transkripcijskih faktorjev.

Induktorska molekula/signal	Referenca
6-hidroksi-nikotin	Malphettes in sod., 2005
biotin (vitamin H)	Weber in sod., 2007
vanilinska kislina (prehransko dopolnilo)	Gitzinger in sod., 2012
floretin (metabolit iz jabolk)	Gitzinger in sod., 2009

V magistrski nalogi smo za namene uravnavanja heterolognih genov uporabili dva inducibilna sistema, Pip_{ON} ter E_{ON}, natančneje opisana v nadaljevanju.

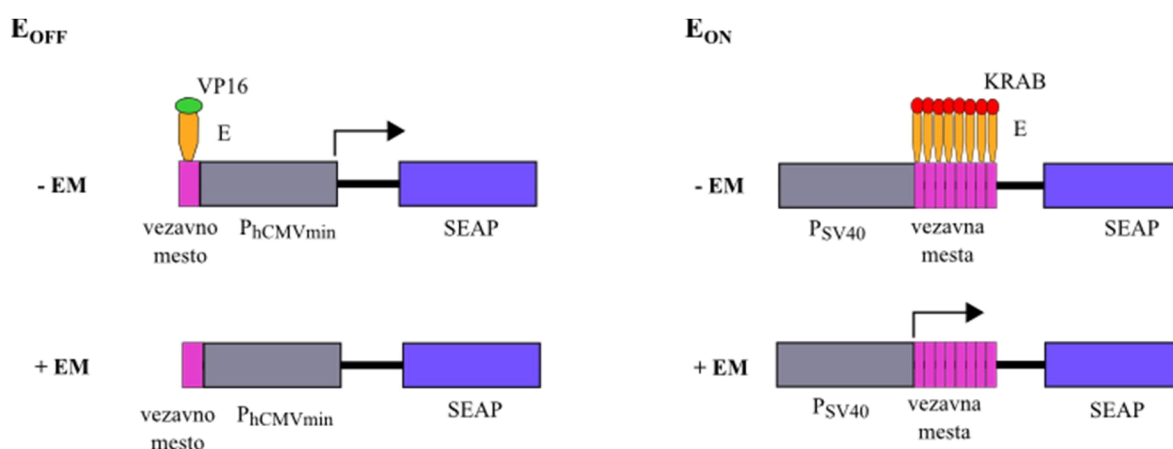
Fussenegger in sod. (2000) so razvili represibilni (Pip_{OFF}) in inducibilni (Pip_{ON}) sistem za uravnavanje genov v sesalskih celicah, ki temelji na represorskem proteinu Pip (ang. pristinamicin-induced protein) iz *Streptomyces coelicolor* (Slika 7). Izražanje genov pod kontrolo tega sistema je odzivno na streptograminski antibiotik pristinamicin. Sistem Pip_{OFF} sestavlja aktivatorski protein (fuzija DNA vezavne domene proteina Pip ter aktivatorske domene VP16), ki v odsotnosti pristinamicina z vezavo na tarčna vezavna mesta pred minimalnim evkariontskim promotorjem (P_{MIN}) povzroči aktivacijo transkripcije poročevalskega gena SEAP (ang. human placental-secreted alkaline phosphatase). V prisotnosti pristinamicina aktivatorski protein disociira iz vezavnega mesta in tarčni gen se ne izraža več. Sistem Pip_{ON} sestavlja represorski protein (fuzija DNA vezavne domene proteina Pip ter represorske domene KRAB), ki se v odsotnosti pristinamicina lahko veže na tarčna vezavna mesta za konstitutivnim virusnim promotorjem (P_{SV40}), kar vodi v inhibicijo izražanja poročevalskega gena SEAP. V prisotnosti pristinamicina represorski protein disociira z vezavnega mesta ter s tem omogoči transkripcijo tarčnega gena.



Slika 7: Represibilni sistem Pip_{OFF} in inducibilni sistem Pip_{ON} za uravnavanje genov v sesalskih celicah, katerih delovanje je odvisno od prisotnosti ali odsotnosti induktorja pristinamicina (PI) (Fussenegger in sod., 2000: 1205).

Weber in sod. (2002) so razvili podobna sistema za uravnavanje izražanja genov, le da je njuno delovanje namesto od streptograminskih antibiotikov odvisno od makrolidnega antibiotika eritromicina. Oba sistema za uravnavanje genov v sesalskih celicah, tako

represibilni (E_{OFF}) kot inducibilni (E_{ON}), temeljita na osnovi interakcije med represorskim proteinom E iz *E.coli* ter pripadajočim tarčnim vezavnim mestom (Slika 8). Sistem E_{OFF} vključuje transaktivatorski protein ET, ki je fuzija represorskega proteina E ter aktivatorske domene VP16. V odsotnosti eritromicina se aktivatorski protein veže na vezavno mesto pred minimalnim promotorjem ($P_{hCMVmin}$), ki izhaja iz človeškega citomegalovirusnega promotorja. To povzroči aktivacijo izražanja reporterskega proteina SEAP. Indukcija z eritromicinom prepreči vezavo aktivatorskega proteina na vezavno mesto, zato se poročevalski gen SEAP ne izraža. Sistem E_{ON} temelji na represorskem proteinu E spojenim z represorsko domeno KRAB. Le-ta se v odsotnosti eritromicina veže na tarčna vezavna mesta, ki se nahajajo za konstitutivnim virusnim promotorjem (P_{SV40}), kar vodi do inhibicije izražanja poročevalskega gena SEAP. V prisotnosti eritromicina represorski protein disociira z vezavnih mest in s tem omogoči izražanje poročevalskega gena SEAP.



Slika 8: Represibilni sistem E_{OFF} in inducibilni sistem E_{ON} za uravnavanje genov v sesalskih celicah, katerih delovanje je odvisno od prisotnosti ali odsotnosti induktorja eritromicina (EM) (Weber in sod., 2002: 902).

2.3.2 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi ortogonalnih elementov

Dobro okarakterizirani transkripcijski faktorji na osnovi naravnih bakterijskih proteinov so sicer odlični gradniki za izdelavo umetnih gensko-regulatornih omrežij v živih organizmih, vendar z nekaj pomanjkljivostmi. Njihovo število je omejeno, kar onemogoča izgradnjo bolj kompleksnih sistemov. Poleg tega bakterijski regulatorni proteini pogosto niso ortogonalni in imajo raznolike biokemijske lastnosti, kar lahko privede do nepričakovanih interakcij med njimi ali celo do interakcij z endogenimi celičnimi komponentami. Idealno bi bilo, če bi imeli na voljo veliko število transkripcijskih faktorjev, ki bi se specifično vezali le na tarčna mesta znotraj umetno načrtovanih gensko-regulatornih mrež z minimalnim vplivom na endogeno celično okolje. Kot idealni elementi za izgradnjo gensko-regulatornih mrež so se izkazali cinkovi prsti in efektorji TAL, saj so ortogonalni, njihova modularna struktura pa omogoča pripravo številnih transkripcijskih faktorjev z različnimi tarčnimi vezavnimi mesti, a s podobnimi biokemijskimi lastnostmi (Garg in sod., 2012).

Sintetični transkripcijski faktorji vsebujejo DNA vezavno domeno, katere tarčno mesto se nahaja v bližini promotorja, odgovornega za izražanje tarčnega gena, ter efektorsko

domeno, ki sproži ali zavre transkripcijo. Do danes je že več raziskovalnih skupin poročalo o sintetičnih transkripcijskih faktorjih. DNA vezavne domene lahko predstavljajo različne proteinske domene, kot so cinkovi prsti (natančneje opisani v poglavju 2.2.1) ali efektorji TAL (natančneje opisani v poglavju 2.2.2). Kot aktivatorska efektorska domena se najpogosteje uporablja domena VP16 ali njena tetramerna oblika VP64, kot represorska efektorska domena pa se najpogosteje uporablja domena KRAB.

Protein VP16 izhaja iz virusa herpes simpleks in je glavni aktivator litične oblike okužbe. Na virusnem promotorju skupaj z gostiteljskima proteinoma Oct-1 in HCF-1, tvori multiproteinski transkripcijski kompleks. Protein VP16 vsebuje izredno ohranjeno osrednjo regijo, ki je ključna za tvorbo multiproteinskega transkripcijskega kompleksa, ter transkripcijsko aktivacijsko domeno. V nasprotju z osrednjo regijo, tako lokacija kot nukleotidno zaporedje transkripcijske aktivacijske domene nista ohranjeni, vendar kljub (Gebelein in Urrutia, 2001) temu le-ta interagira s številnimi faktorji vključenimi v aktivacijo transkripcije (Hall in Struhl, 2002; Wysocka in Herr, 2003).

Leta 1991 so v evkariontih odkrili cinkove prste z domeno KRAB na N-terminalnem koncu (Bellefroid in sod., 1991). Domena cinkovega prsta Cys₂His₂ je odgovorna za vezavo na tarčno DNA, medtem ko domena KRAB deluje kot transkripcijski represor. Domeno KRAB sestavljata škatla KRAB A ter škatla KRAB B, lahko pa je prisotna le ena izmed njiju. Na škatlo KRAB A se veže korepresorski protein, kar neposredno vodi do inhibicije tarčnega gena, medtem ko škatla KRAB B le poveča učinkovitost inhibicije s strani škatle KRAB A, ki je daljša ter bolj ohranjena v primerjavi s škatlo KRAB B (Vissing in sod., 1995; Urrutia, 2003).

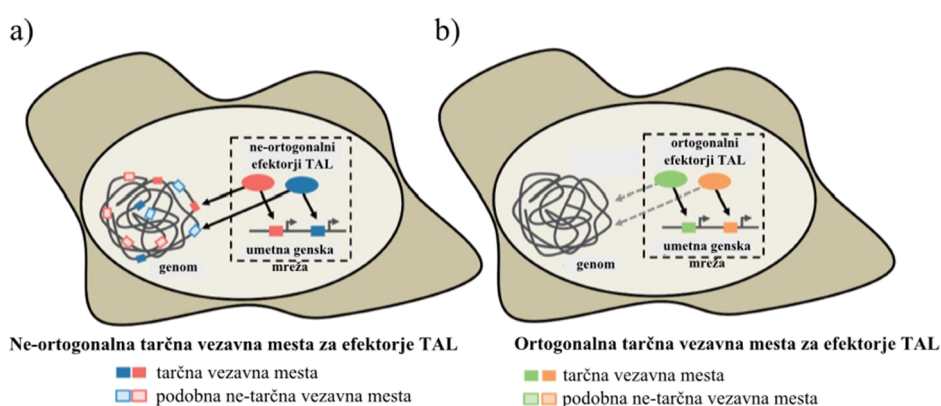
2.3.2.1 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi cinkovih prstov

Do nedavnega so bili cinkovi prsti eni izmed najbolj uporabljanih DNA vezavnih proteinov v sintezni biologiji. Posamezni cinkovi prsti so strukturno neodvisni (Nakaseko in sod., 1992), zato jih lahko med seboj povezujemo in s tem dobimo nove DNA vezavne domene, ki prepoznavajo daljša nukleotidna zaporedja, tudi do 18 baznih parov (Liu in sod., 1997). Z odkritjem DNA-prepoznavne kode (Choo in Klug, 1994) se je pričelo načrtovanje umetnih cinkovih prstov z želeno specifičnostjo in s tem uporaba le-teh za številne aplikacije. Med drugim so raziskovalci z združitvijo umetnih cinkovih prstov z aktivatorsko oziroma represorsko domeno uspeli pripraviti povsem nove sintetične transkripcijske faktorje (Beerli in sod., 1993). Cinkove prste so uspešno združili tudi s funkcionalnimi domenami integras (Tan in sod., 2004), metiltransferaz (Xu in Bestor, 1997), nukleaz (Kim in sod. 1996) in rekombinaz (Akopian in sod., 2003), itd. Cinkovi prsti zaradi njihove modularne strukture lahko poljubno združujemo, hkrati pa imajo podobne biokemijske lastnosti in so ortogonalni, kar je ključno za načrtovanje sintetičnih transkripcijskih faktorjev. Slabost je, da povezovalni segment med prsti vpliva na učinkovitost (Choo in Klug, 1993) ter da ne poznamo cinkovih prstov za vse triplete.

2.3.2.2 Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi efektorjev TAL

Efektorji TAL imajo podobno kot cinkovi prsti modularno zgradbo in sposobnost specifične vezave na DNA. So visoko specifični, lahko se vežejo na poljubno tarčno vezavno mesto ter niso toksični za celice. V primerjavi s cinkovimi prsti je njihova priprava cenejša, hkrati pa je možno načrtovati sintetične efektorje TAL za povsem poljubno nukleotidno zaporedje, medtem ko je za cinkove prste na voljo sicer več modulov, a le-ti ne zastopajo vseh možnih nukleotidnih zaporedij (DeFrancesco, 2011). Poleg tega posamezni moduli cinkovih prstov lahko vplivajo na afiniteto vezave sosednjih prstov na vezavna mesta. Ramirez in sod. (2008) so pokazali, da je le nizek odstotek načrtovanih modularnih cinkovih prstov tudi funkcionalnih. Priprava sintetičnih efektorjev TAL je precej bolj enostavna, saj sosednji moduli ne vplivajo na afiniteto drugih modulov (DeFrancesco, 2011).

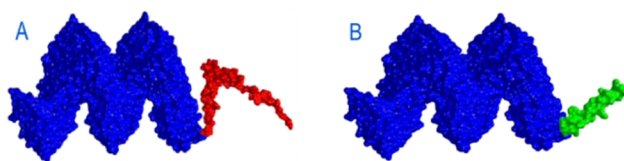
Za sintezne biologe so efektorji TAL zaradi njihove visoke specifičnosti, ortogonalnosti (Slika 9), modularnosti in s tem zmožnosti načrtovanja za vezavo na skorajda katerokoli vezavno mesto odlični kandidati za načrtovanje umetnih transkripcijskih faktorjev.



Slika 9: Ortogonalnost efektorjev TAL. (a) Ne-ortogonalni efektorji TAL načrtovani za uravnavanje genskega izražanja v umetni gensko-regulatorni mreži se prav tako lahko vežejo na podobna ne-tarčna vezavna mesta, ki se nahajajo v endogenih regijah promotorjev znotraj genomske DNA. (b) Ortogonalni efektorji TAL z vezavo na tarčna mesta uravnavajo gensko izražanje le znotraj umetne gensko-regulatorne mreže in se ne vežejo na endogene celične promotorske regije, saj v genovski DNA ni podobnih ne-tarčnih vezavnih mest (Garg in sod., 2012: 2).

Kar nekaj raziskovalnih skupin je za specifično aktivacijo tarčnega gena uporabilo DNA vezavno domeno TAL, spojeno s sesalsko aktivacijsko domeno VP16 ali z njenim tetramernim derivatom VP64 (Garg in sod., 2012; Miller in sod., 2011; Zhang in sod., 2011) (Slika 10b). C-terminalni konec efektorja TAL z dvema endogenima zaporedjema NLS ter endogeno aktivacijsko domeno so zamenjali s sesalskim zaporedjem NLS ter z aktivacijsko domeno VP64 (Garg in sod., 2012; Zhang in sod., 2011).

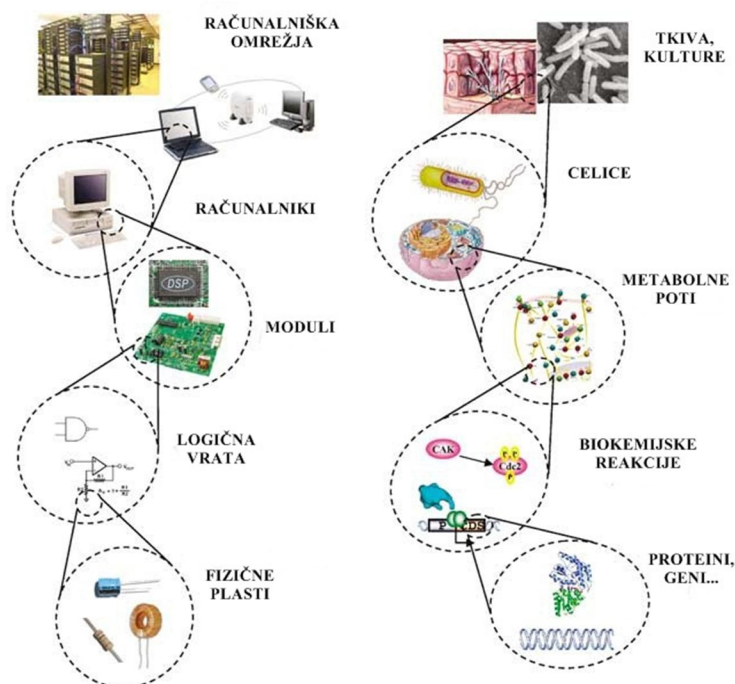
Inhibicija izražanja tarčnega gena je bila dosežena prek fuzije DNA vezavne domene TAL z represorsko domeno KRAB (Slika 10a) (Garg in sod., 2012), medtem ko so Cong in sod. (2012) DNA vezavno domeno TAL spojili z represorsko domeno SID.



Slika 10: Sintetični transkripcijski faktorji na osnovi efektorjev TAL. Model tridimenzionalne strukture TAL DNA vezavne domene spojene z represorsko domeno KRAB (a) in aktivacijsko domeno VP16 (b) (TAL-based ..., 2012).

2.4 UMETNA GENSKO-REGULATORNA OMREŽJA

Sintezna biologija prepleta znanja genetskega inženiringa z znanji računalniških ter inženirskih znanosti, od katerih povzema principe, kot so abstrakcija, standardizacija, modularnost ter ortogonalnost. Vsi ti principi so ključni za pripravo umetnih gensko-regulatornih omrežij. Cilj sintezne biologije je povezovanje standardiziranih oziroma podrobno okarakteriziranih genetskih elementov v različne kompleksne genske sisteme z namenom programiranja celic za opravljanje novih, človeku koristnih nalog. Celice se »programira« z vnosom rekombinantne DNA, kar je primerljivo z računalniškim programiranjem, kjer se uporablja binarna koda. Razlika je le v tem, da je binarna koda dvojiški sistem, ki uporablja niz dveh števk, 1 in 0, medtem ko je zaporedje DNA sestavljeno iz niza štirih različnih nukleotidov. Kljub jasni analogiji med sintezno biologijo ter računalništvom (Slika 11), se sintezni biolog za razliko od računalniškega programerja, ki za programiranje namesto binarne kode uporablja uporabniku prijazno programsko opremo, še vedno ukvarja s spreminjanjem nukleotidnega zaporedja DNA (Panke, 2008). Prav zaradi tega je abstrakcija, ki se ukvarja z odpravljanjem kompleksnosti, ključna v inženirskih znanostih.



Slika 11: Hierarhija, ki prikazuje analogijo sintezne biologije in računalniškega inženirstva (Andrianantoandro in sod., 2006: 2).

Umetno načrtovane gensko-regulatorne mreže delujejo v celičnem okolju, zato je za načrtovanje le-teh ključna ortogonalnost osnovnih genetskih elementov, kar pomeni, da ne interagirajo z endogenim celičnim okoljem in delujejo povsem neodvisno. Implementacija koncepta ortogonalnosti v kompleksno celično okolje za sinteznega biologa predstavlja velik izziv. Oviro predstavlja tudi pomanjkanje takšnih ortogonalnih genetskih elementov, ki bi jih lahko enostavno sestavljali v bolj kompleksne sisteme, kot na primer preklopna stikala (več v poglavju 2.4.1.1), logična vrata ali oscilatorji (Andrianantoandro in sod., 2009; Panke, 2008).

2.4.1 Dosedanji dosežki

Osnova za vsa logična vezja so logična vrata, ki imajo zmožnost izvajanja Boolovih logičnih funkcij, kot so NOT, OR, AND ter vse možne kombinacije le-teh. Logična vrata torej izvajajo logične operacije, kjer en ali več vhodov producira izhode, katerih vrednost je odvisna od tipa logičnih vrat ter vrednosti vhodnih signalov. Elektronska logična vrata so realizirana z uporabo diod ter tranzistorjev, ki delujejo v odvisnosti od vhodnih signalov, kot sta napetost ali tok, medtem ko so vhodni signali pri bioloških logičnih vratih najbolj pogosto različne koncentracije molekul (Khalil in Collins, 2010). To računalniško logiko so prevzeli sintezni biologi, ki so v bakterijskih celicah najprej pripravili le nekaj osnovnih Boolovih logičnih vrat (Guet in sod., 2000; Mayo in sod., 2006; Anderson in sod., 2007). Siuti in sod. (2013) so uspešno realizirali vseh 16 osnovnih Boolovih logičnih vrat in hkrati dosegli, da si celica rezultat logične funkcije tudi zapomni. S povezovanjem teh osnovnih logičnih vrat na različnih nivojih je nekaterim uspelo pripraviti bolj kompleksne biološke programe, kot so na primer bakterije s programom, ki jim omogoča štetje do tri (Friedland in sod., 2009). Kramer in sod. (2004a) ter Ausländer in sod. (2012) so Boolovo logiko uspešno prenesli tudi v sesalske celice.

Goldman in sod. (2013) so pretvorili 739 kB digitalnih podatkov (avdio posnetek govora Martina Luther Kinga, vseh 154 Shakespearovih sonetov, znanstveni članek v PDF formatu, barvno fotografijo Evropskega bioinformatičnega inštituta v JPEG formatu) zapisanih v binarni kodi v nukleotidno zaporedje DNA ter nato to DNA sintetizirali, sekvencirali in uspešno rekonstruirali originalne datoteke s sto odstotno natančnostjo. S tem so dokazali, da je molekula DNA odlična za shranjevanje informacij, kar je osnova tudi vsakega računalnika na osnovi silicija. Kljub temu, da so znanstveniki že dokazali, da ima molekula DNA zmožnost shranjevanja ter prenosa podatkov, je tako imenovano biološko računalništvo še na začetku svoje poti.

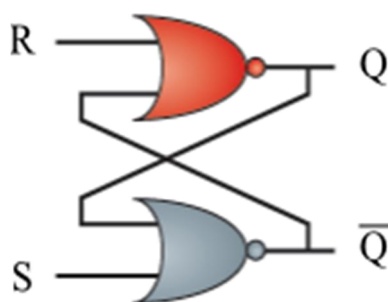
Velik korak naprej je bila priprava prvega genskega preklopnega stikala v *E. coli* na osnovi dveh prokariotskih transkripcijskih represorjev z medsebojno inhibicijo (Gardner in sod., 2000) (natančneje opisano v poglavju 2.4.1.1). Takšno preklopno stikalo za razliko od logičnih vrat, ne le procesira informacije, ampak informacijo o stanju sistema tudi shrani. Kmalu za tem so Kramer in sod. (2004) podobno gensko preklopno stikalo, prav tako na osnovi prokariotskih transkripcijskih represorjev, pripravili v sesalskih celicah (natančneje opisano v poglavju 2.4.1.1).

Elowitz in Leibler (2000) sta v *E.coli* pripravila prvi sintetični oscilator sestavljen iz treh promotorsko-represorskih modulov z medsebojno inhibicijo, ki so se nahajali na skupnem plazmidu. Liho število represorskih elementov je v sistemu onemogočilo zasedbo stabilnega stanja, kar je vodilo do oscilacij v izražanju posameznih represorjev. Oscilacije so spremljali preko poročevalskega gena (zeleni fluorescentni protein), ki se je nahajal na ločenem plazmidu. Tigges in sod. (2009) so delovanje oscilatorja pokazali tudi v sesalskih celicah. Cilj magistrske naloge je priprava genskega preklopnega stikala, zato so genska preklopna stikala v nadaljevanju tudi podrobneje opisana.

2.4.1.1 Genska preklopna stikala

Vloga genskih regulatornih sistemov nekaterih bioloških procesov, kot na primer diferenciacija celic, je vzdrževanje stanja za katerega je bil sprejet signal iz okolja. To stanje si mora celica tudi zapomniti, kar lahko doseže z dedno metilacijo DNA ali z mrežo genov, ki uravnavajo ekspresijo drug drugega (Cherry in Adler, 2000). Opisana so bila že številna naravna epigenetska stikala, ki igrajo pomembno vlogo pri koordinaciji raznolikih procesov v prokariotskih organizmih (Casadesús in D'Ari, 2002) ter pri procesih, kot so celični spomin (Orlando, 2003) in razvoj rastlin (Köhler in Grossniklaus, 2002). Najbolj preprosto gensko stikalo je sistem, kjer vsak izmed dveh represorskih proteinov uravnava sintezo drugega (Monod in Jacob, 1961).

Gensko bistabilno stikalo je enostavno epigenetsko stikalo, ki lahko zavzame eno izmed dveh stabilnih stanj, odvisno od vhodnega signala. S spremembo vhodnega signala lahko preklapljammo iz enega v drugo stanje. Stikalo tudi po odstranitvi vhodnega signala ohrani stabilno stanje, torej deluje kot nekakšna biološka spominska enota, podobno kot v računalništvu, kjer osnovna enota za shranjevanje informacij temelji na dveh med seboj povezanih logičnih vratih NOR (Slika 12) (Khalil in Collins, 2010). Odsotnost obeh induktorjev v populaciji celic vodi do nenadzorovanega izražanja obeh stabilnih stanj – nekatere celice zavzamejo stanje 1, druge stanje 2 (Cherry in Adler, 2000).

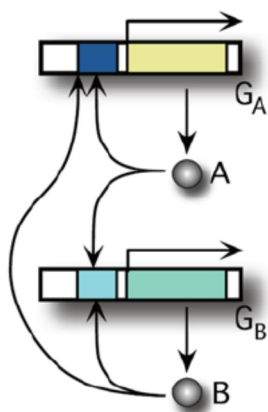


Slika 12: Shema elektronskega vezja sestavljenega iz dveh med seboj povezanih logičnih vrat NOR. Takšno vezje je bistabilno, saj se lahko nahaja v dveh stabilnih stanjih (Q ali $\bar{Q}$) med katerimi možno preklaplja.

Katero končno stanje bo elektronsko vezje zavzelo je odvisno od vhodnega signala (R ali S) (Khalil in Collins, 2010: 368)

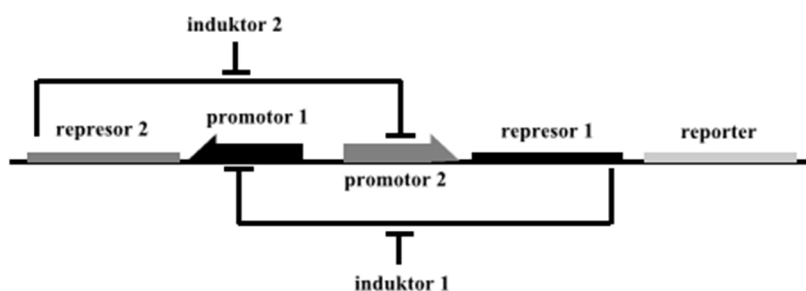
Matematične analize genskih stikal so pokazale, da za dosego funkcionalne bistabilnosti ni dovolj le medsebojna inhibicija dveh represorjev, ampak je potrebna pozitivna kooperativnost vezave, ki izraža nelinearen odziv (Cherry in Adler, 2000). Macía in sod. (2009) ter Widder in sod. (2009) pa so pokazali, da se v principu bistabilnost genskega

stikala lahko doseže tudi z nekooperativnimi genskimi elementi, a le če se v sistem vnese nelinearnost odziva. To bi bilo mogoče v primeru, ko bi protein A lahko hkrati inhibiral transkripcijo proteina B ter aktiviral lastno transkripcijo, kar bi veljalo obratno tudi za protein B (Slika 13). To pomeni, da bi potrebovali transkripcijski faktor, ki bi hkrati deloval kot represor in aktivator.



Slika 13: Shema genskega stikala, ki za dosego bistabilnosti ne zahteva kooperativne vezave transkripcijskih faktorjev. Na podlagi matematičnega modela bi transkripcijski faktor A aktiviral lastno transkripcijo ter hkrati inhibiral transkripcijo transkripcijskega faktorja B, kar obratno velja tudi za transkripcijski faktor B (Widder in sod., 2009: 2).

Prvo umetno epigenetsko preklopno stikalo, ki so ga realizirali v *E. coli*, je temeljilo na dobro okarakteriziranih naravnih bakterijskih transkripcijskih faktorjih TetR in LacI (Gardner in sod., 2000). Uporabili so enostaven sistem dveh konstitutivnih promotorjev ter dveh represorjev z medsebojno inhibicijo (Slika 14). Odvisno od vhodnega signala oziroma induktorja (prehodna kemična ali termična indukcija), je stikalo preklopilo v eno ali drugo stanje, kar so spremljali z izražanjem reporterskega proteina. Ob dodatku induktorja 1 je bilo stikalo v zaprtem (OFF) stanju, z induktorjem 2 pa so stikalo preklopili v odprto (ON) stanje.

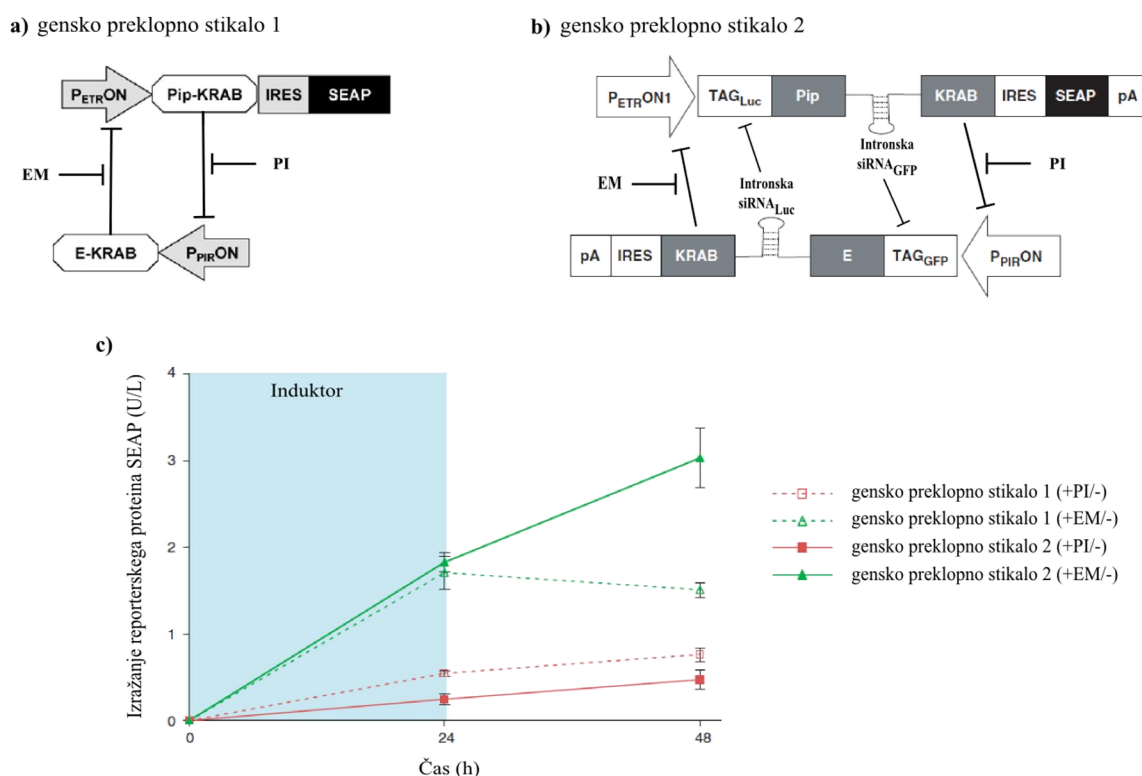


Slika 14: Gensko preklopno stikalo z dvema repesorjema z medsebojno inhibicijo. Induktor 2 inducira transkripcijo reporterskega proteina ter represorskega proteina 1, ki z vezavo na promotor 1 inhibira transkripcijo represorskega proteina 2. Induktor 1 inducira transkripcijo represorskega proteina 2, ki z vezavo na promotor 2 inhibira transkripcijo reporterskega proteina ter represorskega proteina 1 (Gardner in sod., 2000: 339).

Na podoben način kot Gardner in sod. (2000) so Kramer in sod. (2004b) epigenetsko preklopno stikalo realizirali v celicah CHO (ang. Chinese hamster ovary cells). Uporabili so dva transkripcijska kontrolna sistema z medsebojno inhibicijo, P_{ipON} (Fussenegger in sod., 2000) ter E_{ON} (Weber in sod., 2002), ki ju je bilo mogoče inducirati z dodatkom

antibiotika. Dodatek eritromicina je preprečil vezavo represorskega proteina E-KRAB na promotor $P_{ETR}ON$, kar je vodilo v sočasno izražanje represorskega proteina Pip-KRAB ter poročevalskega gena SEAP. Dodatek pristinamicina je preprečil vezavo represorskega proteina Pip:KRAB na promotor $P_{PIR}ON$, kar je vodilo v izražanje represorskega proteina E-KRAB, ki je z vezavo na promotor $P_{ETR}ON$ inhibiral izražanje Pip-KRAB in poročevalskega gena SEAP (Slika 15a). V obeh primerih je bil potreben le začasen dodatek induktorja za preklop iz enega v drugo stanje. Po odstranitvi signala je preklopno stikalo ohranilo stabilno stanje skozi daljše časovno obdobje, tudi več kot tri tedne (Kramer in sod., 2004b). Poleg stabilnosti preklopnega stikala, so Kramer in sod. (2004b) z uspešnim preklapljanjem med dvema stanjema tekom dveh tednov dokazali tudi njegovo reverzibilnost. Ravno stabilnost ter reverzibilnost skozi daljše časovno obdobje sta ključni lastnosti genskega preklopnega stikala. Pomanjkljivost tega stikala je bilo precejšnje puščanje v zaprtem stanju, do katerega pride zaradi same bazalne aktivnosti promotorja. Hkrati je puščanje promotorja tudi razlog za precej nizko indukcijo v odprtem stanju.

Greber in sod. (2008) so gensko preklopno stikalo nadgradili z dodatkom zapisa za intronsko malo interferenčno RNA (siRNA; ang. small interfering RNA), ki je služila za dodatno utišanje izražanja transrepresorskega proteina. Zapis za obe intronski siRNA, tako siRNA_{GFP} kot siRNA_{Luc}, so umestili med oba transrepresorska proteina (Slika 15b). S tem jim je uspelo zmanjšati bazalno aktivnost promotorjev, kar prikazuje tudi graf na sliki 15c. V zaprtem stanju stikala je bilo tako izražanje poročevalskega gena SEAP precej nižje, saj je intronska siRNA_{Luc} z vezavo na vezavno mesto TAG_{Luc} še dodatno utišala izražanje represorskega proteina Pip-KRAB ter poročevalskega gena SEAP. Poleg tega so v odprtem stanju stikala zaradi vezave intronske siRNA_{GFP} na vezavno mesto TAG_{GFP} ter s tem dodatnega utišanja represorskega proteina E-KRAB, dosegli višje izražanje poročevalskega gena SEAP.



Slika 15: Shemi ter dinamika izražanja reporterskega proteina SEAP pri dveh različnih epigenetskih preklopnih stikalih v sesalskih celicah. (a) Gensko preklopno stikalo 1. Dodatek eritromicina (EM) vodi v sočasno izražanje reporterskega proteina SEAP (odprto stanje) ter represorskega proteina Pip-KRAB, ki inhibira izražanje represorskega proteina E-KRAB. Dodatek pristinamicina (PI) pa vodi v izražanje represorskega proteina E-KRAB, ki inhibira izražanje represorskega proteina Pip-KRAB ter reporterskega proteina SEAP (zaprto stanje). IRES (ang. internal ribosome entry side) je nukleotidna sekvenca, ki omogoča iniciacijo translacije na sredini informacijske RNA (Greber in Fussenegger, 2007: 337). (b) Gensko preklopno stikalo 2 se od genskega preklopnega stikala 1 razlikuje le v dodatnem zapisu za dve intronski siRNA znotraj transrepresorskih proteinov E-KRAB ter Pip-KRAB. Intronska siRNA_{Luc} se veže na tarčno mesto TAG_{Luc} in ob indukciji s pristinamicinom še dodatno utiša izražanje represorskega proteina Pip-KRAB ter reporterskega proteina SEAP. Intronska siRNA_{GFP} se veže na tarčno mesto TAG_{GFP} in ob indukciji z eritromicinom še dodatno utiša izražanje represorskega proteina E-KRAB (Greber in sod., 2008: 13). (c) Primerjava izražanja reporterskega proteina SEAP med genskim preklopnim stikalom 1 ter genskim preklopnim stikalom 2 v odvisnosti od dodanega induktorja (eritromicin ali pristinamicin). Za doseg maksimalnega izražanja transrepresorskih proteinov, je zadoščal le prehodni signal induktorjev (na grafu obarvano z modro) (Greber in Fussenegger, 2007: 337).

Umetna genska stikala v sesalskih celicah imajo velik potencial, predvsem za terapevtske aplikacije. Klasični sistem uravnavanja genov za trajno izražanje tarčnega gena zahteva konstantno prisotnost induktorja, kot so na primer antibiotiki. Dolgotrajna izpostavljenost antibiotikom lahko privede do nezaželenih učinkov, kot je razvoj rezistence na antibiotike (Wegener in sod., 1997; Alanis, 2005) ali akumulacija antibiotikov v kosteh ter zobeh (Kapunisk-Uner in sod., 1996; Sanchez in sod., 2004). Pri genskih stikalih je za ohranjanje stabilnega stanja potreben le kratek stimulus induktorja. Pred terapevtsko uporabo so potrebne še izboljšave, na primer minimalizacija puščanja, ko je stikalo v zaprtem stanju. Takšna stikala predstavljajo obetaven začetek na poti do umetnih epigenetskih spominskih naprav v celicah.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Kemomed	štoparica, stekleničke za gojenje celičnih kultur, mikrotitrerske plošče z različnim številom vdolbinic za gojenje celičnih kultur
Applied Biosystems (ABI)	aparatura za verižno reakcijo s polimerazo Veriti [®] Thermal Cycler
Beckman Coulter	centrifuga J2-HS
Berthold Detection Systems	Orion II Microplate Luminometer s pripadajočim računalniškim programom Simplicity 4.2
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Biometra	kadička za agarozno gelsko elektroforezo Horizon [®] 11.4, transiluminator
Brand	avtomatska pipeta HandyStep [®] in nastavki zanjo
Canon	fotoaparat za slikanje agaroznih gelov
Sigma-Aldrich	parafilm
Corning	bele mikrotitrerske plošče s 96 vdolbinicami za merjenje luminiscence, banjice za multikanalko
DNR Bio-Imaging Systems	aparatura za fotografiranje agaroznih gelov
Eppendorf	avtomatske pipete različnih volumnov, multikanalne pipete različnih volumnov, nastavki za pipete (0,1 - 20 µl), mikrocentrifugirke, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R, termoblok Thermomixer R
Euromax	invertni svetlobni mikroskop
Gilson	avtomatske pipete različnih volumnov, nastavki za pipete (5 ml, 10 ml)
Golias	petrijevke
Gorenje	mikrovalovna pečica za segrevanje agaroznih gelov
Hettich	centrifuga Universal 320R
Hoefer	izvor napetosti za agarozno gelsko elektroforezo
ibidi	mikroskopirne komore za celične kulture z 8 vdolbinicami (µ-Slide 8 well)
IKA	magnetna mešala, vrtničnik MS3 basic
inoLab	pH meter WTW series

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Invitrogen	naprava za avtomatsko štetje celic (Countess [®]), števne ploščice, barvilo tripan modro
Iskra-PIO d.o.o	brezprašna komora M18
Kambič	parni sterilizator A-500/700, stresalnik, inkubator
KERN	tehtnica 440-45N
Kimberly-Clarck	rokavice KIMTECH
Leica Microsystems	konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 s pripadajočim računalniškim programom Leica LAS AF Lite za obdelavo podatkov
LTH	hladilnik
MWG Biotech	naprava za verižno reakcijo s polimerazo Primus 96 Plus Thermal Cycler
Nalgene	stojala za mikrocentrifugirke
New Brunswick Scientific	stresalnik/inkubator Innova [®] 42
PlastiBrand	nastavki za avtomatske pipete
Sanyo	skrinja za -80°C
Sarstedt	nastavki za pipete (200 µl, 1000 µl), cetrifugirke različnih volumnov
Sartorius Stedim Biotech	tehtnica
Schott Duran	vsa steklovina (erlenmajerice, čaše, ipd.)
Sutjeska	parni sterilizator
Thermo Scientific	spektrofotometer NanoDrop ND-1000 s pripadajočim računalniškim program ND-1000 V3.7.1 za obdelavo podatkov
TPP	serološke pipete
Zanussi	zamrzovalnik (-20 °C)

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 3: Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem.

Proizvajalec	Kemikalija
Molecular Probes	koelenterazin h
Gibco	gojišče za celične kulture DMEM (GlutaMAX [™] -I), toplotno inaktivirani fetalni goveji serum (FBS)
Carlo Erba Reagent	NaF
Goldbio	ampicilin
Fermentas	DNA standard GeneRuler [™] 1kbp DNA Ladder, 6x DNA nanašalni pufer

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 3. Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem.

Proizvajalec	Kemikalija
Thermo Scientifics	Phusion® High-Fidelity (HF) DNA polimeraza
Inalco	DTT
Invitrogen	DNA polimeraza AccuPrime™ Pfx, AccuPrime™ Pfx reakcijski pufer
Kemika	glicerol, bromfenol modro
Merck	agar-agar, metanol, NaOH, etanol, NaCl, MgCl ₂ , NaCl
New England Biolabs (NEB)	restriksijski encimi (<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>SpeI</i> , <i>XbaI</i>), restriksijski pufri, T4 ligaza, T4 ligazni pufer
IDT	začetni oligonukleotidi
Polyplus-transfection SA	jetPEI™ transfekcijski reagent
Promega	5x lizni pufer, luciferin, agaroza
Sigma-Aldrich	DMSO, gojišče LB po Millerju, akrilamid, etidijev bromid, glicerol, začetni oligonukleotidi, dNTP, tripsin-EDTA, glukoza, EDTA, CoA, PEG 8000, PEG 6000, HEPES, EGTA, natrijev pirofosfat, CDTA, tris, tris-HCl, Na ₂ HPO ₄

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 4: Raztopine in pufri uporabljeni za pripravo DNA konstruktov.

Raztopina/pufer	Sestavine
50x TAE pufer za agarozno gelsko elektroforezo	242 g Tris, 57·1 ml ledocetna kislina, 100 mL 50 mM EDTA, dH ₂ O do 1000 ml, pH 8·0
1% agarozni gel	1 g agaroze, 100 ml 1x TAE pufra
6x nanašalni pufer za agarozno gelsko elektroforezo	0·25% (v/v) bromofenol modro, 0·25% (v/v) ksilencianol, 40% (w/v) glukoze v dH ₂ O
zmes dNTP za reakcijo PCR	2·5 mM dATP, 2·5 mM dCTP, 2·5 mM dGTP, 2·5 mM dTTP v MQ
5x »hitri« ligacijski pufer	66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1 mM ATP, 6% PEG 6000, pH 7·6
5x izotermalni (ISO) reakcijski pufer za lepljenje po Gibsonu	25 % PEG 8000, 0·5 mM Tris-HCl (pH 7·5), 50 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP in 5 mM NAD

Preglednica 5: Raztopine in pufri uporabljeni za delo s celičnimi kulturami.

Raztopina/pufer	Sestavine
fLuc-pufer	2`38 g HEPES (16`60 mM), 0`38 g MgCl <sub>2</sub> (3`33 mM), 0`06 g EGTA-Na (0`08 mM) raztopiš v 100 mL dH ₂ O, uravnaš pH na 7`8 in dodaš še 0`08 g NaF (1`67 mM). V 2`6 mL te mešanice dodamo še 130 µl DTT (16`67 mM), 130 µl ATP (0`44 mM), 130 µl CoA (0`23 mM) in MQ do 13 mL. Luciferin (0`39 mM) raztopimo v 100 µl DMSO in ga dodamo pufru.
Renilla-pufer	2`6 mL 5x Renilla-pufra (3`346 g Na pirofosfat (7`50 mM), 6`9 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (50`00 mM), 14`5 g NaCl (250`00 mM), 1`822 g CDTA (5`00 mM), 5 mL metanol (0`01 l/l), pH 5`0), MQ do 13 mL. Coelenterazin (0`001 mM) raztopimo v 100 µl metanola in ga dodamo pufru.
10x PBS	100 g NaCl, 2`5 g KCl, 14`4 g Na ₂ HPO ₄ , 2`5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MQ do 1 L, pH uravnamo na 7`4.
NaCl za transfekcijo z jetPEI TM	150 mM NaCl

3.1.4 Komercialni kompleti

Preglednica 6: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti z navedbo proizvajalca.

Proizvajalec	Ime kompleta	Uporaba
Fermentas	GeneJet TM Gel Extraction Kit	komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela
Fermentas	GeneJet TM PCR Purification Kit	komplet za čiščenje pomnožkov PCR
Fermentas	GeneJet TM Plasmid Miniprep Kit	komplet za izolacijo plazmidne DNA

3.1.5 Plazmidi

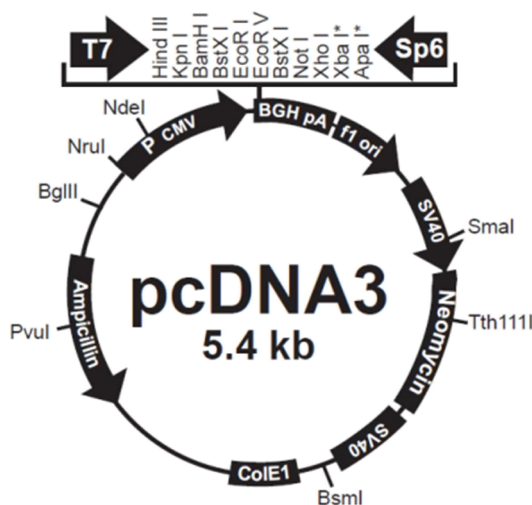
Preglednica 7: Uporabljeni plazmidni vektorji.

Plazmid	Vir
pcDNA3.0	Invitrogen
pGL4.16	Promega
phRL-TK	Promega

3.1.5.1 pcDNA3.0

Vektor se uporablja za izražanje proteinov v sesalskih celicah. Vsebuje močan konstitutivni človeški citomegalovirusni (CMV) promotor ter gena za ampicilinsko in neomicinsko rezistenco, ki omogočata selekcijo transformiranih celic. Vektor nosi zapis za SV40 (Simian virus 40) promotor v katerem se nahaja mesto SV40 ORI (ang. Origin of

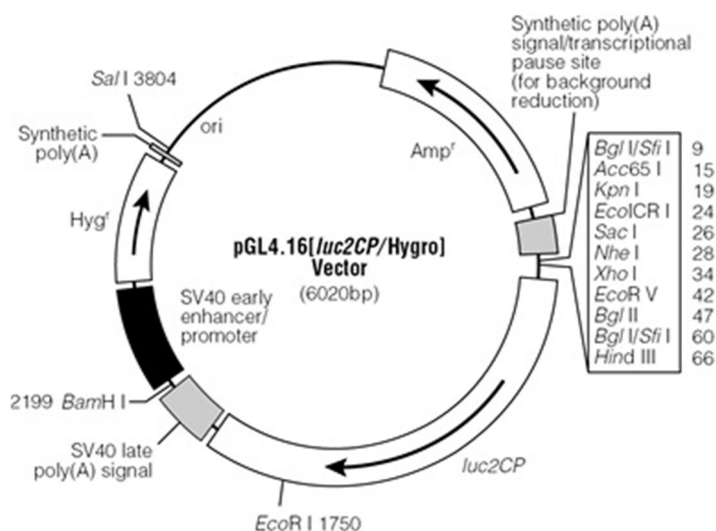
Replication), ki omogoča episomalno pomnoževanje plazmida v celicah, ki izražajo veliki SV40 antigen T (Slika 16).



Slika 16: Shema plazmidnega vektorja pcDNA3 (pcDNA3 ..., 2013).

3.1.5.2 pGL4.16

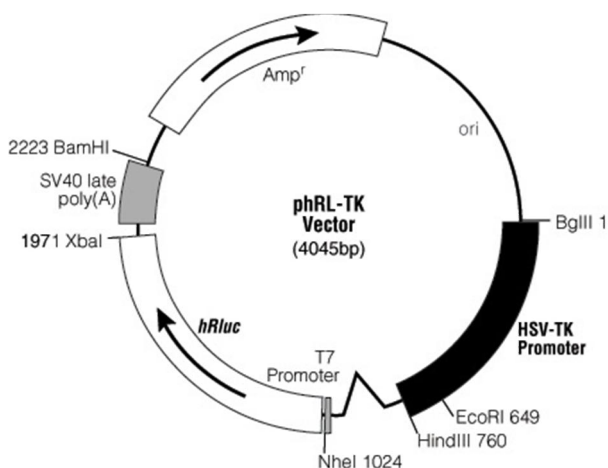
Vektor vsebuje poročevalski gen z zapisom za kresničkino luciferazo, ki vsebuje dve razgradnji nukleotidni sekvenci, imenovani PEST in CL1 (na sliki 17 označeno kot luc2CP). Obe zaporedji pripomoreta k hitrejši razgradnji proteina. Razgradnji označevalec PEST je 40 aminokislin dolgo zaporedje izolirano iz C-terminalne regije mišje ornitin dekarboksilaze, medtem ko razgradnji označevalec CL1 izhaja iz kvasovk. Vektor vsebuje tudi gen za ampicilinsko odpornost.



Slika 17: Shema plazmidnega vektorja pGL4.16 (pGL4.16 ..., 2013).

3.1.5.3 phRL-TK

Reporterski vektor za izražanje v sesalskih celicah smo uporabljali kot kontrolo uspešnosti transfekcije pri dvojnem luciferaznem testu. Vektor vsebuje zapis za *Renilla* luciferazo (na sliki 18 označeno kot hRluc), ki je pod kontrolo konstitutivno aktivnega promotorja HSV-TK (herpes simpleks virusna timidin kinaza). Nosi pa tudi zapis za mesto ORI, kjer se prične pomnoževanje plazmida, ter gen za ampicilinsko odpornost (Slika 18).



Slika 18: Shema plazmidnega vektorja phRL-TK (Synthetic ..., 2002).

3.1.6 Restriksijski encimi

Preglednica 8: Uporabljeni restriksijski encimi.

Restriksijski encim	Prepoznavno mesto	Proizvajalec
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	New England Biolabs (NEB)
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	New England Biolabs (NEB)
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	New England Biolabs (NEB)
<i>SpeI</i>	A↓CTAGT	New England Biolabs (NEB)
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA	New England Biolabs (NEB)

3.1.7 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 9: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za verižno reakcijo s polimerazo.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Opis	Nukleotidno zaporedje*
Gib_start(Eco)-f	prileganje na Eco-start-His-TAL	5' <u>gaattcgccaccatgcaccac</u> 3'
Gib_start_pMIN-r	prileganje na vektor pGL4.16 z minimalnim promotorjem, vsebuje ročico za Eco-start-His-TAL	5' gtcgtggtggtggtggtggtgcatggtggcgaattcgggtggttaccacacagtaccg 3'

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 9. Začetni oligonukleotidi uporabljeni za verižno reakcijo s polimerazo.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Opis	Nukleotidno zaporedje*
Gib_t2a_TAL-f	prileganje na efektorje TAL, vsebuje ročico za t2A	5' ggagaggaagtcttctgacgtcggagacgtcgaagaga atcctggaccatg <u>gactacaaa</u> gaccatgacgg 3'
Gib_t2a_GFP-r	prileganje na GFP, vsebuje ročico za t2A	5' ttctcttcgacgtctccgcaggtcagaagacttctctccct cggctctcttgtacagctcgtcc 3'
Gib_stop(pGL)-f	prileganje na vektor pGL4.16, vsebuje ročico za stop-Xba	5' taatctagaatcgctgtcacagacatgataagatacattgat gagtttgg 3'
Gib_stop(Xba)_VP16-r	prileganje na domeno VP16, vsebuje ročico za stop-Xba-pGL4.16	5' caatgtatcttatcatgtctgtgacagcgattctagattacc accgtactcgtcaattcc 3'
KRAB_t2A-r	prileganje na domeno KRAB, vsebuje ročico za t2A	5' ttctcttcgacgtctccgcaggtcagaagacttctctccct cggctctt <u>aactgatgatttgattt</u> caaatgc 3'
Gib_pCMV-f	prileganje na promotor CMV	5' tagtaatcaattacggggtcattag 3'
Gib_pCMV-r	prileganje na promotor CMV	5' gtaacgcggaactccatatatgggc 3'
Gib_start_NLS-f	prileganje na NLS, vsebuje ročico za vektor pcDNA3	5' cgagctcgctagcgccaccatgcaccaccaccaccacca cgaattccaaagaagaaacggaagg 3'
Gib_shlink_KRAB-r	prileganje na domeno KRAB, vsebuje ročico za kratek linker	5' cccacttctctaga <u>aactgatgatttgattt</u> caaatgc 3'

* Podčrtani deli oligonukleotidnih začetnikov predstavljajo dele nukleotidnega zaporedja, ki prilegajo na matrično DNA.

3.1.8 Organizmi

3.1.8.1 Bakterijski sevi

Preglednica 10: Uporabljeni bakterijski sevi *E. coli*.

Sev	Genotip	Vir
DH5α	F'/supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1, relA1	Zbirka sevov Kemijskega inštituta
Top 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen

3.1.8.2 Celične kulture

Preglednica 11: Uporabljene celične kulture.

Celična kultura	Opis	Vir
HEK293T	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic z vstavljenim velikim SV40 antigenom T	Carsten Kirschning (Tehniška Univerza München)

3.1.9 Gojišča

Seve bakterije *E. coli* smo gojili v tekočem ter na trdnem LB gojišču. Za gojenje celic človeške linije HEK293T smo uporabili DMEM z dodanim 10 % FBS.

Preglednica 12: Sestava uporabljenih gojišč.

Ime gojišča	Sestava
Tekoče LB gojišče	25 g/l LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt)
Trdno LB gojišče	25 g/l LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt) 15 g/l agar 50 µg/ml ampicilin
Gojišče za celične kulture	0.5 l DMEM 55ml 10 % FBS

3.2 METODE

3.2.1 Priprava gojišč

3.2.1.1 Gojišča za bakterije

Tekoče LB gojišče smo pripravili tako, da smo v destilirani vodi raztopili ustrezno količino gojišča LB po Millerju (Preglednica 12). Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto in ga do uporabe hranili na sobni temperaturi. Pred inokulacijo smo gojišču sterilno dodali še 50 µg/ml ustreznega antibiotika.

Trdno LB gojišče smo pripravili tako, da smo v destilirani vodi raztopili ustrezno količino gojišča LB po Millerju ter agar (Preglednica 12). Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto in šele, ko se je gojišče ohladilo na približno 50 °C smo sterilno dodali ustrezen antibiotik (ampicilin v končni koncentraciji 75 µg/ml, kanamicin v končni koncentraciji 50 µg/ml, kloramfenikol v končni koncentraciji 35 µg/ml). Gojišče smo rahlo premešali in ga vlili v sterilne petrijevke, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku na 4 °C.

3.2.1.2 Gojišča za celične kulture

Gojišče za celične kulture smo pripravili tako, da smo v 0·5 l svežega gojišča DMEM sterilno dodali 55 ml 10 % FBS.

3.2.2 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Ves temperaturno neobčutljiv material, ki smo ga potrebovali za gojenje bakterijskih in celičnih kultur smo sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto (20 minut, 121 °C, 1·2 bar), medtem ko smo temperaturno občutljive raztopine sterilizirali s filtracijo preko filtra s premerom por 0·2 µm.

3.2.3 Priprava genskih konstruktov z metodami molekularnega kloniranja

V nadaljevanju so natančneje opisane metode molekularnega kloniranja (Ausubel in sod., 2002), s katerimi smo pripravili genske konstrukte uporabljene v magistrskem delu.

3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za verižno reakcijo s polimerazo smo uporabljali DNA polimerazo AccuPrime™ Pfx ali DNA polimerazo Phusion® High-Fidelity. Količine posameznih komponent za pripravo ene PCR reakcijske mešanice in prav tako tudi temperaturni ter časovni profili reakcij so odvisni od tega, katero DNA polimerazo smo uporabili (preglednice 13-16).

Preglednica 13: Sestava ene reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo AccuPrime™ Pfx.

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (µL)
Matrična DNK	20 ng/µl	0·4 ng/µl	1
Začetni oligonukleotid 1	20 pmol/µl	0·4 pmol/µl	1
Začetni oligonukleotid 2	20 pmol/µl	0·4 pmol/µl	1
AccuPrime™ Pfx reakcijski pufer	10 x	1 x	5
DNA polimeraza AccuPrime™ Pfx	2·5 U/µl	0·05 U/µL	1
MQ			41
Skupni volumen			50

Preglednica 14: Temperaturni in časovni profil verižne reakcije z DNA polimerazo AccuPrime™ Pfx.

Stopnja		Temperatura	Čas
Začetna denaturacija		94 °C	2 min
30 ciklov	1. Denaturacija	94 °C	15 s
	2. Prileganje začetnih oligonukleotidov*	(T _m -5) °C	30
	3. Podaljševanje	68 °C	1min/1 kbp
Končno podaljševanje		68 °C	7 min
Konec		10 °C	∞

Preglednica 15: Sestava ene reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo Phusion® High-Fidelity.

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μL)
Matrična DNK	20 ng/μl	0.4 ng/μl	1
Začetni oligonukleotid 1	50 μM	0.5 μM	0.5
Začetni oligonukleotid 2	50 μM	0.5 μM	0.5
5x Phusion reakcijski pufer	5 x	1 x	10
dNTP	10 mM	200 μM	1
DNA polimeraza Phusion® High-Fidelity	2.5 U/μl	0.05 U/μL	1
MQ			36
Skupni volumen			50

Preglednica 16: Temperaturni in časovni profil verižne reakcije z DNA polimerazo Phusion® High-Fidelity.

Stopnja	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	98 °C	1 min
30 ciklov	1. Denaturacija 2. Prileganje začetnih oligonukleotidov* 3. Podaljševanje	98 °C (T _m -5) °C 72 °C 15 s 30 20 s/1 kbp
Končno podaljševanje	72 °C	5 min
Konec	10 °C	∞

- * Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov je odvisna od dolžine in sestave začetnih oligonukleotidov. V splošnem velja, da je temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov za 5 °C nižja od najnižje talilne temperature (T_m; angl. melting temperature) v paru začetnih oligonukleotidov uporabljenih v verižni reakciji s polimerazo. Talilna temperatura je opredeljena kot temperatura pri kateri bo polovica dvoverižne DNA disocirala in postala enoverižna DNA. Za posamezen začetni oligonukleotid smo talilno temperaturo izračunali po spodnji formuli:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) \text{ °C} \quad \dots(1)$$

G - število gvaninov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico.

C - število citozinov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico.

A - število adeninov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico.

T - število timidinov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico.

3.2.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost reakcije PCR ter prav tako uspešnost restrikcij plazmidnih vektorjev in kontrolnih restrikcij, smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Gostota agaroznega gela je odvisna od dolžine pričakovanih fragmentov, in sicer daljši kot so fragmenti gostejši gel pripravimo, in obratno. Običajno smo pripravili 1 % (w/v) agarozni gel. Zatehtali smo 1 g agaroze, ki smo jo vmešali v 100 ml 1xTAE pufru ter jo raztopili s

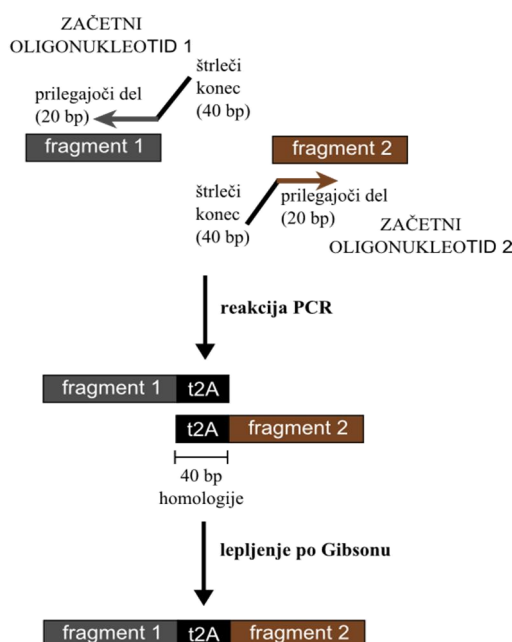
segrevanjem v mikrovalovni pečici. Ko se je mešanica nekoliko ohladila, smo dodali 2 μ l etidijevega bromida (10 g/l), gel vlili v kadičko in pustili približno pol ure, da se je gel strdil. V žepke agaroznega gela smo nanašali vzorce z dodanim nanašalnim pufrom (1x). Poleg vzorcev smo v stranske žepke vedno nanegli še DNA standard (GeneRuler™ 1kbp DNA Ladder), ki nam je omogočil določiti dolžino DNA fragmentov v vzorcih. Elektroforeza je potekala v 1xTAE pufru ter pri konstantni napetosti 100 V približno 45 minut. Gel smo nato slikali pod UV lučjo.

3.2.3.3 Čiščenje fragmentov DNA iz agaroznega gela

Iz agaroznega gela smo s skalpelom izrezali fragmente DNA pričakovanih dolžin in jih prenesli v mikrocentrifugirke. Fragmente DNA smo iz agaroznega gela očistili z uporabo komercialno dostopnega kompleta GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas). V zadnjem koraku smo očiščene fragmente DNA iz kolonce eluirali z 50 μ l MQ ter na spektrofotometru NanoDrop izmerili koncentracijo DNA.

3.2.3.4 Lepljenje po Gibsonu

Za lepljenje po Gibsonu (Gibson in Russello, 2013) smo najprej pripravili ustrezne začetne oligonukleotide za reakcijo PCR. Metoda temelji na združevanju fragmentov s homolognimi konci, ki se tekom reakcije PCR s pomočjo načrtovanih začetnih oligonukleotidov dodajo na 3' in 5' konce fragmentov. Med fragmenti, ki jih želimo združiti je potrebno približno 40 bp homologije, zato potrebujemo začetne oligonukleotide sestavljene iz 40 bp dolgega štrlečega konca, ki je homologen fragmentu s katerim ga želimo združiti, ter 20 bp dolgega dela, ki prilega na matrico. Z ustreznim načrtovanjem začetnih oligonukleotidov lahko med fragmente vnesemo tudi poljubno krajše nukleotidno zaporedje (npr. t2A sekvenco, jedrni lokalizacijski signal, peptidni povezovalc, ipd.) (Slika 19).



Slika 19: Metoda lepljenja po Gibsonu. Shema prikazuje kako lahko s štrlečimi homolognimi konci med dva fragmenta vnesemo poljubno krajše nukleotidno zaporedje (npr. t2A sekvenco).

Ko smo z reakcijo PCR, v kateri smo uporabili predhodno ustrezno načrtovane začetne oligonukleotide, namnožili želene fragmente ter plazmidni vektor, smo uspešnost reakcije preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Fragmente zelenih dolžin smo očistili iz agaroznega gela z uporabo komercialno dostopnega kompleta GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas) ter izmerili koncentracijo DNA na spektrofotometru NanoDrop.

Pripravili smo reakcijsko mešanico (Preglednica 17), ki smo jo razdelili na alikvote po 15 μ l in jo shranili na -20 °C. Pred uporabo smo reakcijsko mešanico odtajali na ledu ter dodali 5-7 μ l fragmentov PCR (10-100 ng vsakega PCR fragmenta v masnem razmerju 1:1), ki smo jih želeli združiti. Sledila je 60 minutna inkubacija na 50 °C, po kateri smo vseh 20 μ l reakcijske mešanice transformirali v kompetentne celice *E. coli*.

Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu.

Komponenta	Volumen (μ l)
Pufer ISO (5x)	320
Eksonukleaza T5 (1 U/ μ l)	0.64
DNA polimeraza Phusion (2 U/ μ l)	20
DNA ligaza Taq (40 U/ μ l)	160
MQ	700
Skupni volumen	1200

3.2.3.5 Restrikcija

Plazmidno DNA smo rezali z restriktivnimi endonukleazami, ki prepoznavajo točno določeno nukleotidno zaporedje (Preglednica 8). Reakcijska mešanica je vsebovala matrično DNA (največ 3 µg), 0,5 µl restriktivnih endonukleaz (10 U/µl) na 1 µg matrične DNA, 5 µl restriktivskega pufru (10x) ter MQ do končnega volumna 50 µl. Takšne količine komponent v reakcijski mešanici smo pripravili, kadar smo fragmente rezane z restriktivnimi endonukleazami v naslednjem koraku molekularnega kloniranja uporabili za ligacijo. Kadar pa smo želeli le preveriti ali so se nam želeni fragmenti DNA vstavili v plazmidni vektor, smo naredili tako imenovano restriktivno analizo. V tem primeru je reakcijska mešanica vsebovala 500 ng matrične DNA, 0,5 µl restriktivnih endonukleaz (10 U/µl), 2 µl restriktivskega pufru (10x) ter MQ do končnega volumna 20 µl. Katerega izmed restriktivnih pufrov smo uporabili je bilo odvisno od uporabljenih restriktivnih endonukleaz, saj so le-te aktivne samo v določenih puffrih. Restriktivno mešanico smo 1-4 ure inkubirali na 37 °C. Čas inkubacije je bil odvisen od količine DNA in sicer, večja kot je bila količina DNA, daljši je bil čas inkubacije. Po končani inkubaciji smo restrikcije takoj nanесли na agarozni gel. Če smo rezane fragmente potrebovali za ligacijo, smo fragmente želenih dolžin iz agaroznega gela očistili z uporabo komercialno dostopnega kompleta GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas) ter izmerili koncentracijo DNA na spektrofotometru NanoDrop. V primeru restriktivnih analiz smo agarozni gel le slikali pod UV lučjo.

3.2.3.6 Ligacija

Fragmente DNA, ki smo jih želeli združiti skupaj, smo rezali z enako kombinacijo restriktivnih endonukleaz, s čimer smo dobili fragmente s komplementarnimi lepljivimi konci. Z ligazo DNA, ki katalizira nastanek fosfodiesterne vezi, so se ti komplementarni konci zlepi skupaj. Pri ligaciji je pomembno molarno razmerje med vektorjem ter fragmentom, ki ga vstavljamo v vektor. V vektor lahko vstavljamo enega ali dva fragmenta (3-točkovna ligacija). Običajno razmerje vektor:fragment je 1:3. Maso fragmenta smo izračunali po formuli:

$$masa_{fragment} = \frac{masa_{vektor} \cdot dolžina_{fragment}}{dolžina_{vektor}} \cdot 3 \quad \dots(2)$$

Pripravili smo ligacijsko mešanico, ki je vsebovala 30-100 ng vektorja, izračunano količino fragmenta/-ov, 1 µl T4 ligaze (400 U/µl), 4 µl 5x hitrega ligacijskega pufru ali 2 µl 10x T4 ligacijskega pufru ter MQ do končnega volumna 20 µl. Ligacijsko mešanico smo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi (5x hitri ligacijski pufer) ali 3 ure na sobni temperaturi oziroma 18 ur pri 16 °C (10x T4 ligacijski pufer), odvisno kateri ligacijski pufer smo uporabili. Tej mešanici smo nato dodali 30 µl MQ, od tega smo 25 µl transformirali v kompetentne celice *E.coli*.

3.2.3.7 Transformacija kompetentnih celic *E.coli*

Za transformacijo celic smo uporabili metodo s toplotnim šokom, kjer hitra sprememba temperature povzroči odprtje por v celični membrani, kar omogoči vstop plazmidne DNA v celico. Kompetentne celice *E.coli*, shranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtalili na ledu ter jim dodali 25 μl ligacijske mešanice ali 20 μl Gibson reakcijske mešanice ali 1 μl plazmidne DNA, ki smo jo želeli pomnožiti. Celice smo 30 minut inkubirali na ledu, sledil je toplotni šok 2-4 minute na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1-2 minuti inkubacije na ledu. Nato smo sterilno dodali 1 ml tekočega LB gojišča ter eno uro stresali (500 rpm) na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po eni uri smo celice centrifugirali pri 7000 rpm 3 minute. Usedlino celic smo nato resuspendirali v manjšem volumnu supernatanta (približno 100 μl) ter jo sterilno razmazali na trdno LB gojišče z že dodanim ustreznim antibiotikom. Plošče smo inkubirali 12-16 ur na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posamezne kolonije, ki so zrasle na ploščah, smo z zobotrebcom sterilno prenesli v 10 ml tekoče LB gojišče ter dodali ustrezen antibiotik. Kulturo smo s stresanjem (160 rpm) inkubirali približno 12 ur na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.8 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo iz tekoče kulture izolirali s komercialno dostopnim kompletom GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). V zadnjem koraku smo očiščeno plazmidno DNA iz kolonce eluirali z 100 μl MQ ter na spektrofotometru NanoDrop izmerili koncentracijo DNA.

3.2.3.9 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo plazmidne DNA smo določili s spektrofotometrom NanoDrop, ki 1 μl vzorca izmeri absorbanco pri 260 nm (valovna dolžina pri kateri imajo nukleinske kisline absorpcijski maksimum) in na koncu poda izračunano koncentracijo DNA. Prav tako nam poda razmerje absorbanco izmerjenih pri 280 nm in 260 nm, s čimer ocenimo čistost našega vzorca. Sprejemljivo razmerje $A_{260}:A_{280}$ je približno 1,8. V primeru, da je razmerje precej nižje, to nakazuje na prisotnost nečistoč, kot so proteini, fenoli, in drugi kontaminanti, ki absorbirajo svetlobo pri 280 nm.

3.2.3.10 Določitev nukleotidnega zaporedja

Ko smo z restrikcijsko analizo potrdili, da se je v vektor vstavil fragment DNA želene dolžine, smo morali potrditi še pravilnost nukleotidnega zaporedja. Zmešali smo 40-60 ng/ μl plazmidne DNA, 1' 25 μl začetnega oligonukleotida in MQ do končnega volumna 10 μl ter konstrukte poslali na sekvenciranje (GATC Biotech).

3.2.3.11 Priprava trajnih kultur

Po potrditvi pravilnega nukleotidnega zaporedja genskih konstruktov, smo pripravili trajne kulture, kar nam je omogočilo nadaljnjo hitrejše namnoževanje konstruktov. Zmešali smo

1 ml sveže bakterijske kulture, ki je vsebovala želen plazmid, ter 1 ml 50 % (v/v) glicerola. Mešanico smo shranili na - 80 °C.

3.2.4 Delo s celičnimi kulturami

3.2.4.1 Gojenje celic človeške linije HEK293T

Celice HEK293T smo gojili v gojišču DMEM z dodanim 10 % FBS ter jih nato vzdrževali v kontrolirani atmosferi pri 95 % vlažnosti, 37 °C ter 5 % CO₂. Gojenje je potekalo v posodah, prevlečenih s polistirenom, ki celicam omogoča pritrjanje na podlago ter rast v monosloju. Na približno tri do štiri dni smo celicam zamenjali gojišče, ko pa so celice dosegle okoli 90 % konfluentnost, smo le-te presadili in zredčili. Najprej smo iz posodice odstranili gojišče in celice dvakrat sprali s 5 ml PBS, s čimer smo odstranili vse ostanke gojišča, ki bi lahko inhibirali delovanje tripsina. Nato smo dodali 2 ml tripsina z EDTA, ter pustili približno 1 minuto, da so se celice odlepili od podlage. Delovanje tripsina smo nevtralizirali z dodatkom 8 ml gojišča DMEM z 10 % FBS. Suspenzijo celic smo prenesli v 15 ml centrifugirko ter centrifugirali 5 minut pri 1200 rpm. Odstranili smo supernatant ter celice resuspendirali v 10 ml svežega gojišča DMEM z 10 % FBS. Od 10-30 % suspenzije celic smo vrnili nazaj v gojitveno posodico, ki smo jo predhodno sprali z 10 ml PBS.

3.2.4.2 Štetje in nacepljanje celic HEK293T v gojitvene plošče

Po tripsinizaciji smo preostanek celic, ki jih nismo vrnili v gojitveno posodico, uporabili za nacepitev mikrotitrskih plošč. Resuspendiranim celicam smo dodali barvilo tripan modro, v volumskem razmerju 1:1, od tega smo 10 µl uporabili za štetje celic na napravi za avtomatsko štetje celic (Countess™). Število nacepljenih celic je bilo odvisno od velikosti vdolbinic na mikrotitrskih ploščah (Preglednica 18) (jetPEI™ ..., 2012). Za potrebe merjenja luciferazne aktivnosti smo nacepili bele mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinicami, za potrebe mikroskopiranja pa smo nacepili posebne mikroskopične komore z 8 vdolbinicami (µ-Slide 8 well).

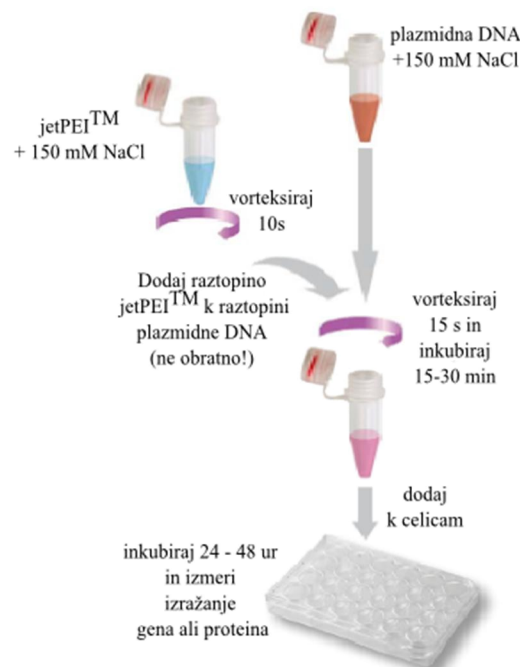
Preglednica 18: Priporočeno število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče (jetPEI™ ..., 2012).

Število vdolbinic	Število celic / vdolbinico	Površina vdolbinice (cm ²)	Volumen gojišča / vdolbinico (ml)
96	10 000 - 17 000	0.3	0.1 - 0.2
8	25 000 - 28 000	1	0.2 - 0.25

3.2.4.3 Prehodna transfekcija celic HEK293T

Dan pred izvedbo prehodne transfekcije smo ustrezno število celic nacepili v mikrotitrsko plošče (Preglednica 18) ter jih inkubirali pri 95 % vlažnosti, 37 °C ter 5 % CO₂. Približno 50-70 % konfluentne celice smo transficirali po navodilih proizvajalca transfekcijskega reagenta jetPEI™ (Slika 20). Ustrezno mešanico plazmidne DNA smo zmešali s 150 mM

NaCl, nato smo temu dodali mešanico transfekcijskega reagenta jetPEITM (2 μ l jetPEITM / 1 μ g plazmidne DNA) ter 150 mM NaCl. Po 20-30 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo transfekcijsko mešanico dodali k celicam (jetPEITM ..., 2012).



Slika 20: Prehodna transfekcija celic HEK293T po protokolu proizvajalca jetPEITM (jetPEITM ..., 2012: 6).

3.2.4.4 Stimulacija celic HEK293T

Pri optimizaciji pristinamicinskega in eritromicinskega inducibilnega sistema ter pri testiranju genskih preklopnih stikal, smo celice takoj po transfekciji stimulirali s pristinamicinom (2 μ g/ml) ali/in eritromicinom (2 μ g/ml). Celicam, ki smo jih uporabili za eksperimente s konfokalno fluorescentno mikroskopijo, smo na dva dni menjali gojišče in ponovno dodali ustrezen antibiotik. Način redčenja obeh induktorjev je naveden v preglednici 19.

Preglednica 19: Redčitve induktorjev pristinamicina ter eritromicina.

Induktor	Začetna koncentracija (topilo)	Redčitev (topilo)	Končna koncentracija v celičnem gojišču (% topila)
pristinamicin	50 g/L (100 % DMSO)	20 mg/L (1 % DMSO)	2 mg/L (0.1 % DMSO)
eritromicin	50 g/L (100 % etanol)	20 mg/L (1 % etanol)	2 mg/L (0.1 % etanol)

3.2.5 Merjenje luciferazne aktivnosti

Za merjenje luciferazne aktivnosti smo celice nacepili v bele mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami ter jih transficirali s kontrolnim plazmidom phRL-TK (10 ng), s poročevalskim plazmidom, ki je vseboval zapis za kresničkino luciferazo (fLuc), ter z ostalimi konstrukti DNA (odvisno od eksperimenta). Izražanje poročevalskega plazmida je odvisno od eksperimentalnih pogojev, medtem ko izražanje kontrolnega plazmida služi kot kontrola za uspešnost transfekcije. Celice smo lizirali po dveh ali treh dneh inkubacije tako, da smo odesali gojišče ter v vsako vdolbinico dodali 30 μ l 1x liznega pufra (Promega). Plošče smo zamrzili na - 80 °C in pripravili pufra za merjenje aktivnosti obeh poročevalskih genov. Aktivnost obeh encimov je možno izmeriti v enem vzorcu, saj imata le-ta različna substrata. Luciferazno aktivnost smo izmerili luminometrom Orion II Microplate. Z izračunom razmerja fLuc/rLuc (RLE – relativne luciferazne enote) smo normalizirali aktivnost poročevalskega plazmida na kontrolni plazmid, tako da vrednosti fLuc niso odvisne od učinkovitosti transfekcije ali celične viabilnosti (Dual-Luciferase® ..., 2011).

3.2.6 Konfokalna fluorescentna mikroskopija

Celice HEK293T smo nacepili v gojitvene komore z 8 vdolbinicami in jih pri 50-70 % konfluentnosti transficirali z različnimi plazmidi (odvisno od eksperimenta). Za opazovanje živih celic pod mikroskopom smo uporabili konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 na Leica DMI 6000 CS stojalu. Celice smo pričeli spremljati tri dni po transfekciji, nato vsak dan naslednje tri dni (preklopno stikalo z dvema represorjema) oziroma vsak dan naslednjih 9 dni (preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko). Tretji dan po transfekciji smo celicam zamenjali gojišče in ponovno dodali ustrezen induktor. Pri testiranju preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko smo gojišče menjali še vsak drugi dan in vsakokrat dodali tudi ustrezen induktor. Za spremljanje stikal na konfokalnem mikroskopu smo uporabili 20x objektiv z numerično aperturo 1.4. V eksperimentih smo uporabljali tri različne fluorescentne proteine, katerih fluorescenco smo vzbujali z različnimi laserji. Modri fluorescentni protein BFP smo vzbujali z 405 nm diodnim laserjem, emisijsko okno smo nastavili na 420-500 nm. Rumeni fluorescentni protein mCitrine smo vzbujali s 514 nm multi-ionskim argonskim laserjem, emisijsko okno smo nastavili na 520-570 nm. Oranžni fluorescentni protein mCherry smo vzbujali z 543 nm laserjem HeNe, emisijsko okno smo nastavili na 550-620 nm. Za kasnejšo obdelavo slik smo uporabili računalniška programa Leica LAS AF Lite ter ImageJ.

4 REZULTATI

4.1 IZBIRA DNA VEZAVNIH DOMEN

Za namene magistrske naloge smo želeli uporabiti DNA vezavne proteine, ki bi zadostili kriterijem modularnosti, standardizacije ter ortogonalnosti, zato smo se odločili za efektorje TAL. Modularna struktura efektorjev TAL nam omogoča enostavno sestavljanje ponovitev z načrtovanimi RVD-ji in s tem načrtovanje novih DNA vezavnih proteinov. Te lahko spojimo z različnimi funkcionalnimi domenami, s čimer dobimo popolnoma nove proteine, ki jih v naravi ne najdemo. Ker lahko DNA vezavne proteine načrtujemo za katerokoli vezavno mesto, lahko pripravimo takšne efektorje TAL, ki nimajo tarčnih mest nikjer v človeškem genomu, kar zadosti kriteriju ortogonalnosti. V magistrski nalogi smo uporabili že okarakterizirane DNA vezavne domene TAL, ki smo jih izbrali iz literature (Sander in sod., 2011). Uporabili smo TAL #1257, ki smo ga poimenovali TALA, ter TAL #1297, ki smo ga poimenovali TALB (Slika 21).



Slika 21: Shema TALA ter TALB DNA vezavnih domen ter pripadajoča tarčna vezavna mesta, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi. Posamezne ponovitve so prikazane kot obarvani pravokotniki v katerih so z dvema črkama označeni RVD-ji, pod njimi pa je prikazan nukleotid, ki ga RVD veže. Tarčna vezavna mesta so navedena v smeri 5' - 3', z začetnim timidinom (označen z malimi pisanimi črkami) (povzeto po Sander in sod., 2011).

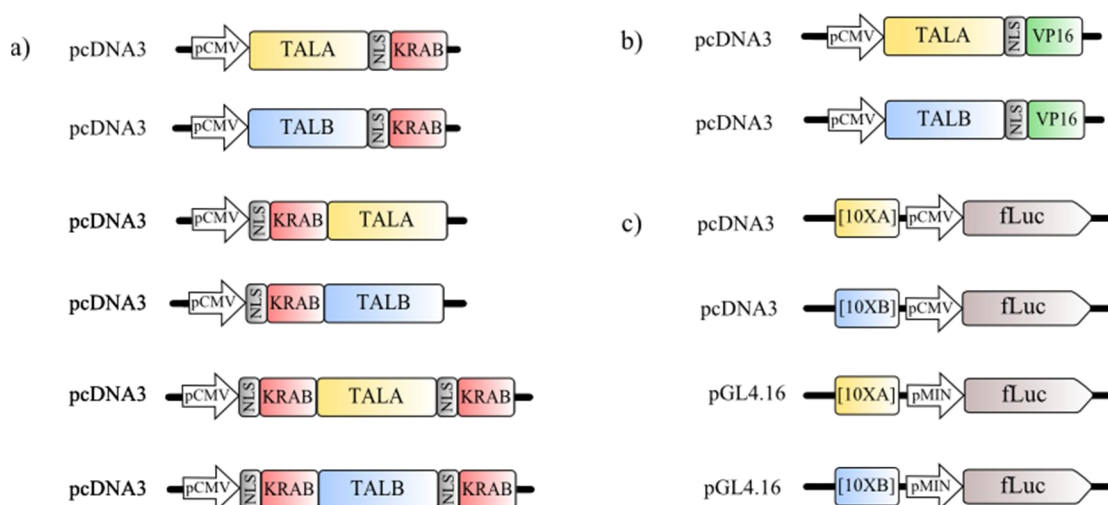
Sintetična vezavna mesta, ki so vsebovala 10 ponovitev vezavnih mest za TALA oziroma za TALB, smo naročili pri komercialnemu ponudniku (IDT). Med projektom iGEM 2012 smo pripravili reporterske plazmide, ki so vsebovali različno število (1, 2, 4, 7 in 12) ponovitev vezavnih mest za NicTAL (eden izmed testiranih efektorjev TAL, ki ga nismo uporabili za nadaljnje eksperimente) in eksperimentalno ugotovili (TAL-based ..., 2012), da je za doseganje najvišje stopnje represije optimalno število vezavnih mest 7 ali več, zato smo se odločili, da bomo za vse nadaljnje eksperimente uporabili 10 ponovitev vezavnih mest.

4.2 PRIPRAVA IN TESTIRANJE TRANSKRIPCIJSKIH FAKTORJEV TAL

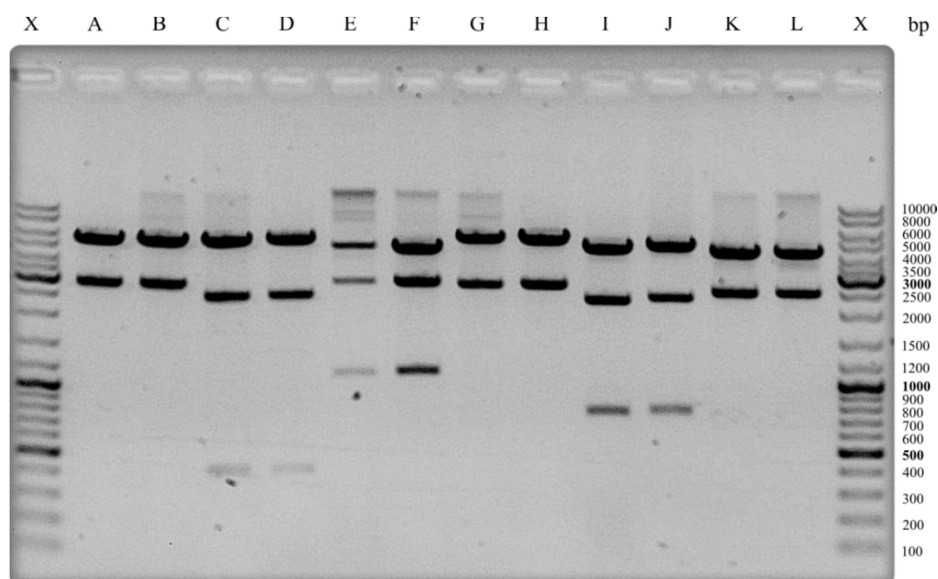
4.2.1 Priprava konstruktov

Glavno orodje, ki smo ga uporabili v magistrskem delu, so sintetični transkripcijski faktorji na osnovi efektorjev TAL. Sintetične transkripcijske faktorje smo pripravili s fuzijo DNA vezavne domene efektorjev TAL in aktivatorske domene VP16 ali represorske domene KRAB. Pri tem smo uporabili metodo lepljenja po Gibsonu oziroma metodo restrikcije in ligacije. Pri pripravi DNA konstruktov je sodelovalo več članov ekipe iGEM 2012.

Pripravili smo represorja TALA ter TALB z različnimi mesti vgraditve represorske domene KRAB z dodanim NLS. To smo vnesli na N-terminalni konec ali C-terminalni konec ali na oba konca DNA vezavne domene TALA ali TALB (Slika 22a). Pripravljena aktivatorja TALA in TALB sta aktivatorsko domeno VP16 z dodanim NLS vsebovala na C-terminalnem koncu (Slika 22b). Vezavna mesta za represorje in aktivatorje TAL smo z metodami molekularnega kloniranja vstavili pred različne promotorje (pMIN in pCMV). Za promotor smo v isti vektor vstavili poročevalski gen fLuc (Slika 22c). Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 23) in s sekvenciranjem (Priloga A in B). Kot je razvidno iz slike gela (Slika 23), vse dolžine DNA fragmentov ustrezajo pričakovanim dolžinam.



Slika 22: DNA konstrukti, ki smo jih uporabili za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL. (a) Represorji TALA in TALB v vektorju pcDNA3 pod kontrolo konstitutivnega promotorja (pCMV), ki imajo represorsko domeno KRAB skupaj z NLS na C-terminalnem koncu ali N-terminalnem koncu ali na obeh terminalnih koncih DNA vezavne domene TALA oziroma TALB. (b) Aktivatorja TALA in TALB. Fuzija DNA vezavne domene TALA oziroma TALB z aktivatorsko domeno VP16 skupaj z NLS v vektorju pcDNA3 pod kontrolo konstitutivnega promotorja (pCMV). (c) Poročevalski plazmidi uporabljeni za testiranje učinkovitosti sintetičnih transkripcijskih faktorjev TAL. Deset ponovitev vezavnih mest za regulatorje TALA in TALB se nahaja pred minimalnim (pMIN) ali konstitutivnim (pCMV) promotorjem, ki nadzirata izražanje poročevalskega gena fLuc.



Slika 23: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL. Restriksijske mešanice (proge A-L) in DNA lestvico (progi X) smo nanesli na 1 % agarozni gel. Kontrolne restrikcije smo izvedli z restriksijskimi encimi navedenimi v Preglednici 20, v kateri so navedena tudi imena DNA konstruktov skupaj s pričakovanimi dolžinami fragmentov.

Preglednica 20: Restriksijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za testiranje aktivatorjev TAL in represorjev TAL ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.

Oznaka na agaroznem gelu	Ime DNA konstrukta	Restriksijski encimi	Pričakovane dolžine DNA fragmentov
X	DNA lestvica GeneRuler™ 1kbp DNA Ladder		
A	TALA:KRAB	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5401 bp, 2856 bp
B	TALB:KRAB	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5401 bp, 2856 bp
C	KRAB:TALA	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5403 bp, 2430 bp, 432 bp
D	KRAB:TALB	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5403 bp, 2430 bp, 432 bp
E	KRAB:TALA:KRAB	<i>SpeI</i> in <i>XbaI</i>	4731 bp, 2835 bp, 1123 bp
F	KRAB:TALB:KRAB	<i>SpeI</i> in <i>XbaI</i>	4731 bp, 2835 bp, 1123 bp
G	TALA:VP16	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5401 bp, 2709 bp
H	TALB:VP16	<i>EcoRI</i> in <i>XbaI</i>	5401 bp, 2709 bp
I	[10XA]-CMV-fLuc	<i>SpeI</i> in <i>EcoRI</i>	4824 bp, 2255 bp, 773 bp
J	[10XB]-CMV-fLuc	<i>SpeI</i> in <i>EcoRI</i>	4824 bp, 2255 bp, 773 bp
K	[10XA]-pMIN-fLuc	<i>EcoRI</i>	4301 bp, 2442 bp
L	[10XB]-pMIN-fLuc	<i>EcoRI</i>	4301 bp, 2442 bp

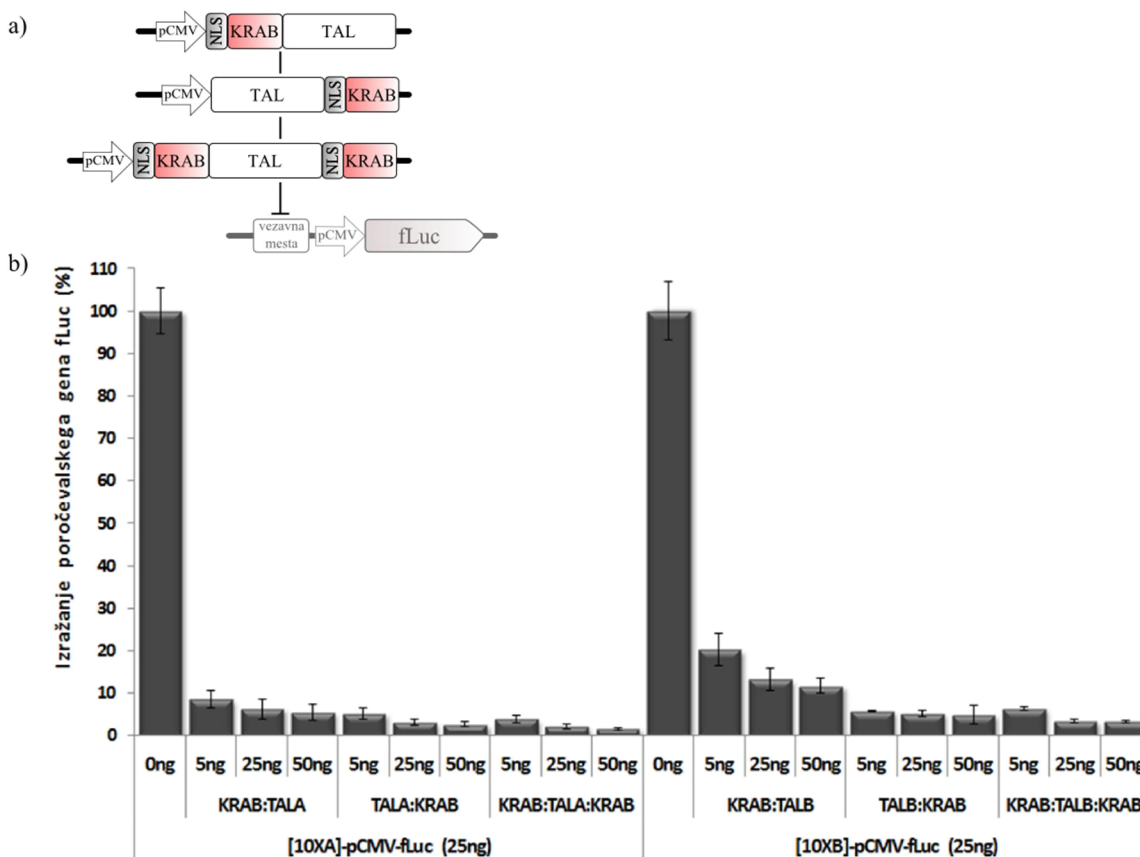
4.2.2 Učinkovitost in specifičnost represorjev TAL

Želeli smo preveriti kakšen odstotek inhibicije izražanja poročevalskega gena lahko dosežemo s sintetičnimi represorji TAL ter kako na učinkovitost represije vpliva pozicija represorske domene KRAB. Zanimalo nas je tudi ali je inhibicija izražanja poročevalskega gena res posledica specifične vezave represorjev TAL na tarčna vezavna mesta. V celice človeške linije HEK293T smo s prehodno transfekcijo vstavili ustrezne plazmide (Priloga C in D). Tri dni po transfekciji smo z metodo merjenja luciferazne aktivnosti, ki je

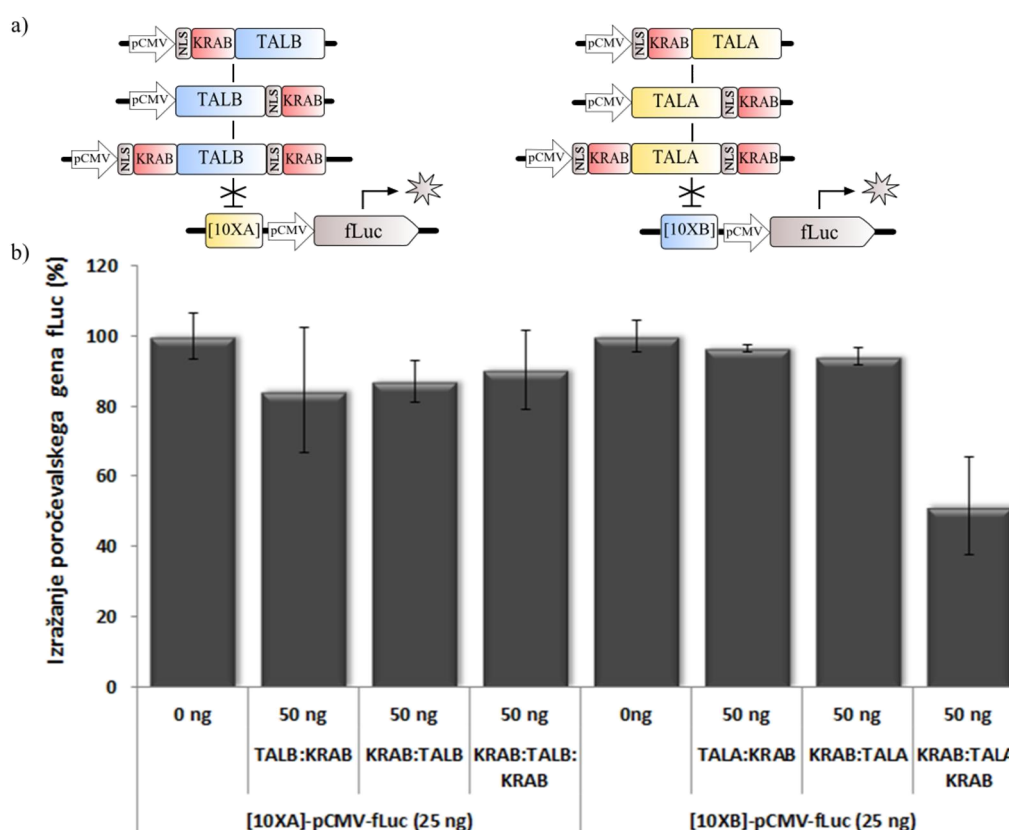
podrobneje opisana v poglavju Materiali in metode, preverili učinkovitost inhibicije poročevalskega gena fLuc z represorji TALA in TALB. Testirali smo različne količine represorjev TALA in TALB z represorsko domeno na N-terminalnem ali C-terminalnem koncu ali na obeh terminalnih koncih.

Rezultati kažejo, da smo z vsemi testiranimi represorji TAL, ne glede na pozicijo domene KRAB (Slika 24a), dosegli več kot 90 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena (Slika 24b).

Najvišjo inhibicijo izražanja poročevalskega gena, kar 98 odstotno, smo dosegli z represorji TAL z represorsko domeno KRAB na obeh terminalnih koncih (Slika 24b). Dokazali smo, da se vsi represorji TAL specifično vežejo na tarčna vezavna mesta, razen represor TALA z represorsko domeno KRAB na obeh terminalnih koncih, kjer se je nivo izražanja poročevalskega gena, pred katerim so se nahajala vezavna mesta za napačen represor TAL, vidno zmanjšal (Slika 25b). Na podlagi dobljenih rezultatov smo se za nadaljnje eksperimente odločili uporabiti represorje TALA in TALB z represorsko domeno na C-terminalnem koncu.



Slika 24: Učinkovitost delovanja sintetičnih represorjev TALA oziroma TALB v odvisnosti od pozicije represorske domene KRAB v človeških celicah HEK293T. (a) Shema represorjev TAL ter poročevalskega plazmida, s katerimi smo testirali učinkovitost inhibicije poročevalskega gena fLuc. (b) Inhibicija izražanja poročevalskega gena fLuc ob vezavi represorjev TALA oziroma TALB na pripadajoča vezavna mesta pred konstitutivnim promotorjem (pCMV). Izražanje poročevalskega gena smo primerjali z izražanjem v odsotnosti represorja TAL. Predpostavili smo, da je izražanje poročevalskega gena v tem primeru maksimalno.

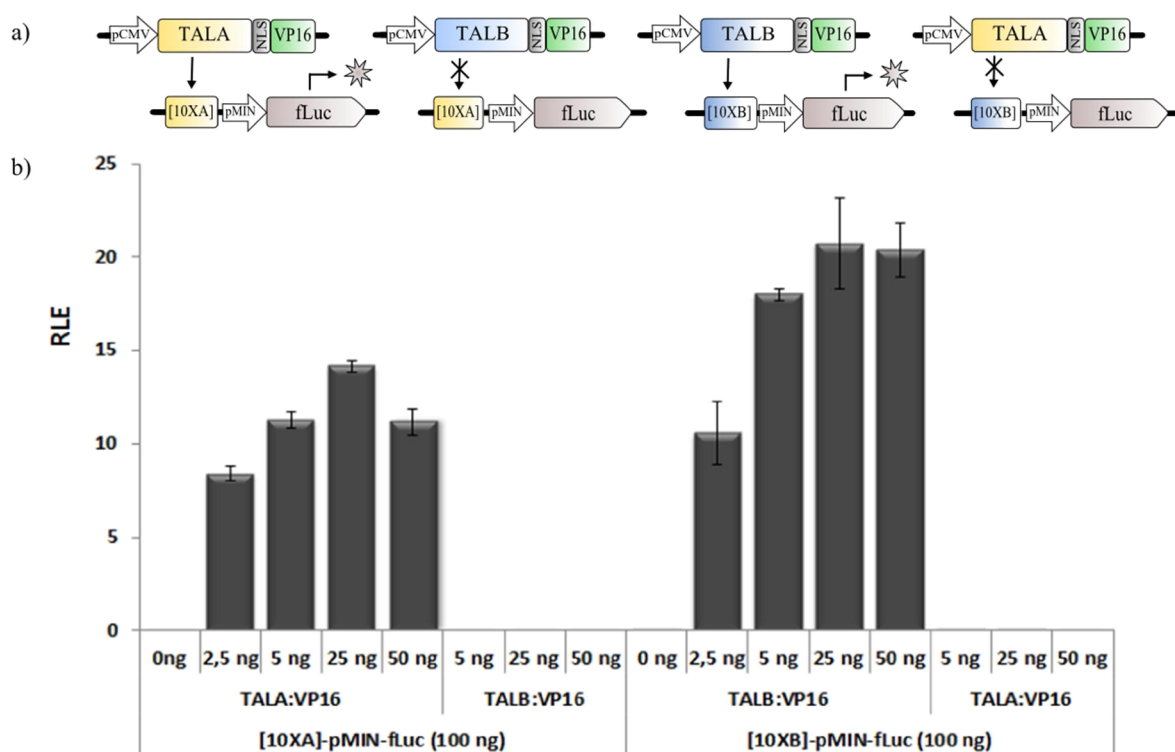


Slika 25: Testiranje medsebojne ortogonalnosti represorjev TALA in TALB v človeških celicah HEK293T.

(a) Represorji TALA in TALB ter poročevalska plazmida, s katerimi smo testirali specifičnost vezave represorjev TAL na pripadajoča vezavna mesta. (b) Izražanje poročevalskega gena fLuc pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV), pred katerim se nahajajo vezavna mesta za napačen represor TAL. Izražanje poročevalskega gena smo primerjali z izražanjem v odsotnosti represorja TAL. Predpostavili smo, da je izražanje poročevalskega gena v tem primeru maksimalno.

4.2.3 Učinkovitost in specifičnost aktivatorjev TAL

Zanimalo nas je kakšen nivo aktivacije izražanja poročevalskega gena lahko dosežemo z sintetičnimi aktivatorji TAL ter ali je aktivacija izražanja poročevalskega gena res posledica specifične vezave aktivatorjev TAL na tarčna vezavna mesta. V celice človeške linije HEK293T smo s prehodno transfekcijo vstavili ustrezne plazmide (Priloga E) ter dva dni po transfekciji z metodo merjenja luciferazne aktivnosti, ki je podrobneje opisana v poglavju Materiali in metode, preverili učinkovitost aktivacije izražanja poročevalskega gena fLuc z aktivatorji TALA in TALB. Testirali smo različne količine aktivatorjev TALA in TALB z aktivatorsko domeno VP16 na C-terminalnem koncu. Rezultati kažejo, da z aktivatorji TAL lahko dosežemo tudi do 3000-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena, medtem ko ob prisotnosti vezavnih mest za napačen aktivator TAL, ne pride do izražanja poročevalskega gena (Slika 26b). S tem smo potrdili specifičnost vezave aktivatorjev TAL na pripadajoča vezavna mesta.

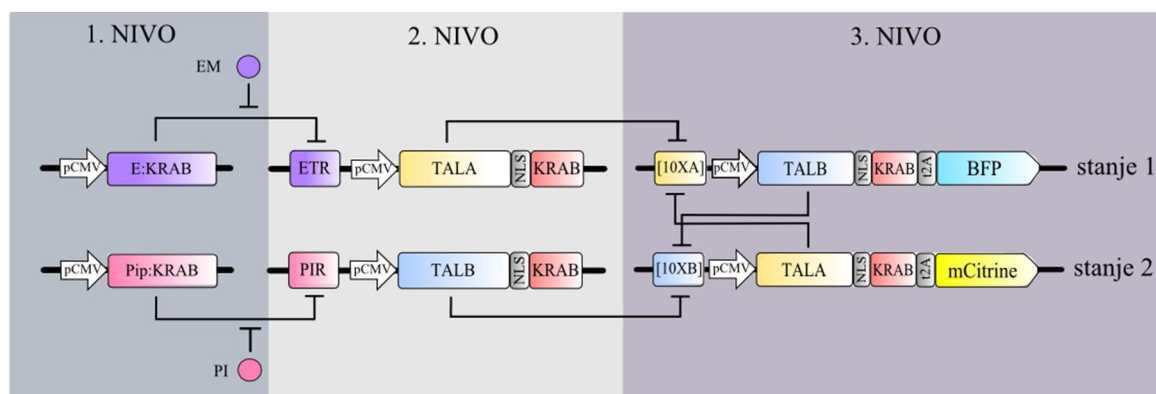


Slika 26: Učinkovitost delovanja aktivatorjev TALA in TALB ter testiranje medsebojne ortogonalnosti aktivatorjev TALA in TALB v človeških celicah HEK293T. (a) Shema aktivatorjev TALA in TALB ter pripadajočih poročevalskih plazmidov s katerimi smo testirali učinkovitost ali specifičnost vezave aktivatorjev TAL. (b) Izražanje poročevalskega gena fLuc ob vezavi aktivatorja TALA ali TALB na vezavna mesta pred minimalnim promotorjem (pMIN). V primeru testiranja specifičnosti vezave so poročevalski plazmidi vsebovali vezavna mesta za napačen aktivator TAL. Izražanje poročevalskega gena smo primerjali z izražanjem v odsotnosti TAL aktivatorja.

4.3 PREKLOPNO STIKALO Z DVEMA REPRESORJEMA

4.3.1 Zasnova in delovanje stikala

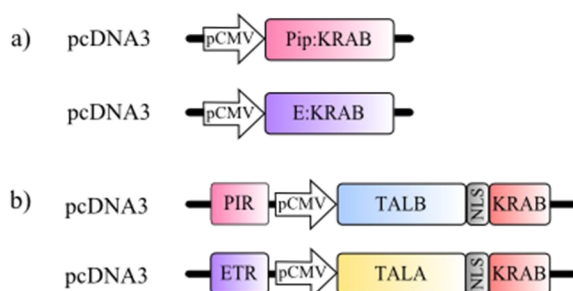
V celicah človeške linije HEK293T smo pripravili preklopno stikalo, sestavljeno iz dveh represorjev TAL, ki inhibirata transkripcijo drug drugega. Stanje stikala smo želeli nadzorovati z zunanjimi signali, zato smo potrebovali še inducibilna sistema, ki bi nam omogočila indukcijo enega ali drugega stanja stikala. Uporabili smo že poznana inducibilna sistema Pip_{ON} (Fussenegger in sod., 2000) ter E_{ON} (Weber in sod., 2002). Sistem Pip_{ON} se inducira s pristinamicinom (PI), sistem E_{ON} pa z eritromicinom (EM). Delovanje obeh inducibilnih sistemov je opisano v poglavju 2.3.1. Zasnova in delovanje stikala sta prikazana na sliki 27. Takšno stikalo iz vidika računalniške logike predstavlja dvoje med seboj povezanih logičnih vrat NOR.



Slika 27: Preklopno stikalo z dvema represorjema. Stikalo sestavljajo trije nivoji. Prvi nivo vsebuje inducibilne represorje (E:KRAB in Pip:KRAB), ki v odvisnosti od induktorja, pristinamicina (PI) ali eritromicina (EM), uravnava izražanje represorjev TAL v drugem nivoju. Le-ti z vezavo na tarčna vezavna mesta v tretjem nivoju povzročijo inhibicijo prepisovanja drugega represorja TAL iz para. V tretjem nivoju se nahajata dva represorja TALA in TALB, ki se medsebojno inhibirata. Vsak izmed njiju je prek peptida t2A povezan s poročevalskim fluorescentnim proteinom (BFP ali mCitrine), kar omogoča spremljanje stanja stikala.

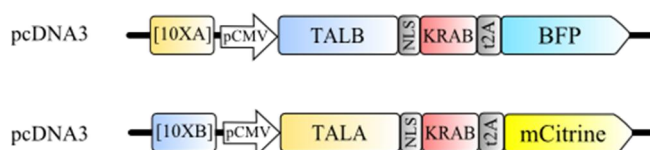
4.3.2 Priprava konstruktov

Tekom projekta iGEM 2012 smo skupaj s člani ekipe sistema Pip_{ON} ter E_{ON} z metodo restrikcije in ligacije (opisano v poglavju Materiali in metode) prilagodili za uporabo v genskem stikalu na osnovi efektorjev TAL. Pripravili smo vezavno domeno proteina Pip spojeno z represorsko domeno KRAB pod kontrolo konstitutivnega promotorja pCMV (Slika 28a) ter DNA vezavno domeno proteina E spojeno z represorsko domeno KRAB pod kontrolo konstitutivnega promotorja pCMV (Slika 28a). Vezavna mesta za oba represorska proteina Pip:KRAB (PIR) in E:KRAB (ETR) smo vstavili pred konstitutivni promotor pCMV, odgovoren za izražanje represorjev TAL (Slika 28b). Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 30) in s sekvenciranjem (Priloga A in B). Kot je razvidno iz slike gela (Slika 30), vse dolžine DNA fragmentov ustrezajo pričakovanim dolžinam.

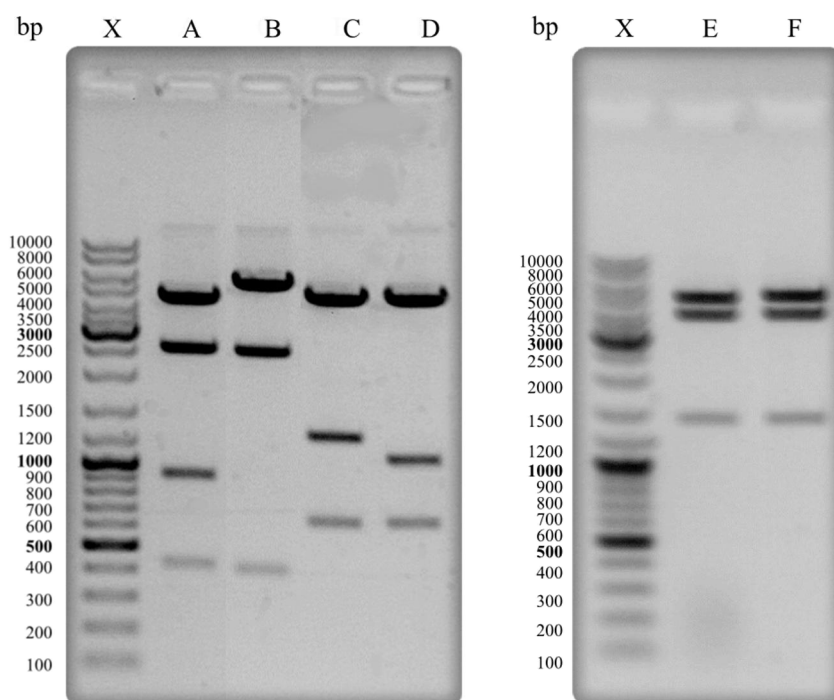


Slika 28: DNA konstrukti za pripravo inducibilnih sistemov. (a) Inducibilni represor Pip:KRAB pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV) v vektorju pcDNA3 ter inducibilni represor E:KRAB pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV) v vektorju pcDNA3. (b) Represorji TAL pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV) pred katerim se nahajajo vezavna mesta za inducibilni represor Pip:KRAB (PIR) ali E:KRAB (ETR).

Za spremljanje stanj stikala smo uporabili modri fluorescentni protein BFP in rumeni fluorescentni protein mCitrine, ki sta bila preko peptida t2A povezana z represorjema TAL (Slika 29). Pri translaciji pride do samo-cepitve oligopeptida t2A, kar omogoči, da se gena povezana preko peptida t2A pod kontrolo enega promotorja prepiseta v dva ločena proteina. Tako BFP kot mCitrine smo dobili na Kemijskem inštitutu, Laboratorij za biotehnologijo. DNA konstrukti so bili z metodami molekularnega kloniranja (opisano v poglavju Materiali in metode) pripravljene med projektom iGEM 2012, pri čemer je sodelovalo več članov ekipe. Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 30) in s sekvenciranjem (Priloga A in B). Kot je razvidno iz slike gela (Slika 30), vse dolžine DNA fragmentov ustrezajo pričakovanim dolžinam. DNA fragmentov krajših od 100 bp na gelu nismo uspeli videti.



Slika 29: DNA konstrukti za preklapno stikalo z dvema represorjema. Konstrukta vsebujeta zapis za fluorescentni protein (BFP ali mCitrine) ter zapis za represor TAL, povezana s sekvenco t2A. Oba gena sta pod kontrolo konstitutivnega promotorja (pCMV) pred katerim se nahajajo vezavna mesta za nasprotni represor TAL.



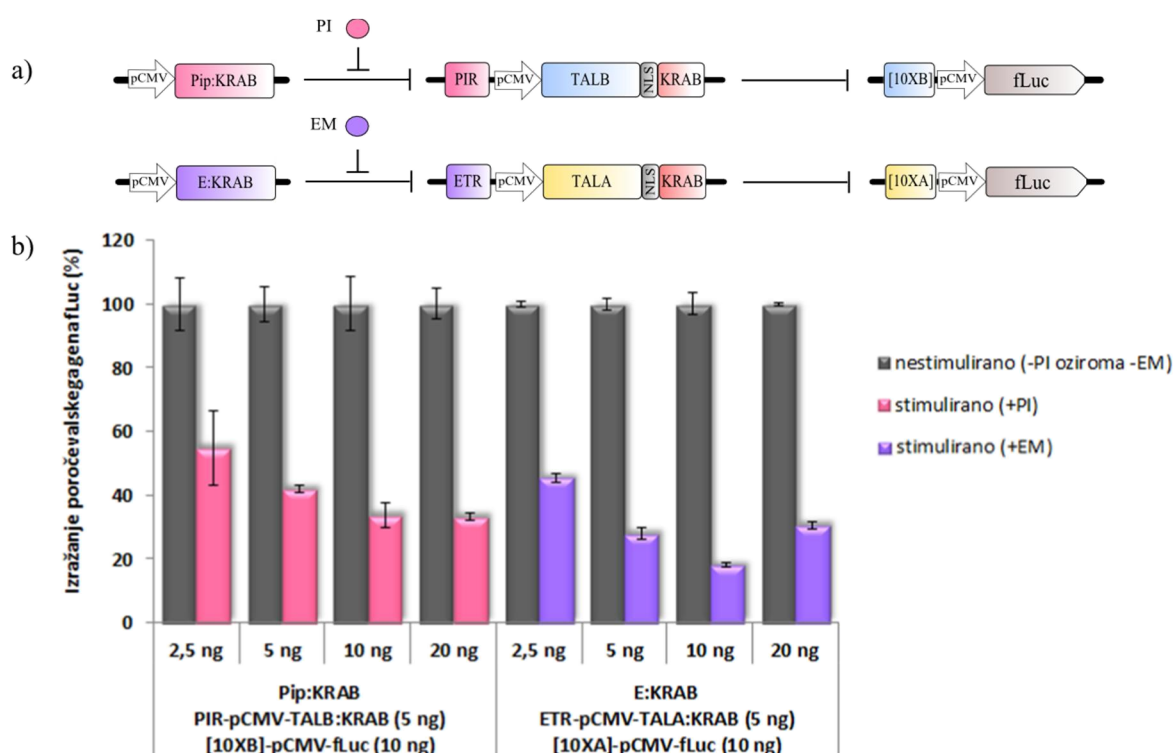
Slika 30: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za pripravo preklapnega stikala z dvema represorjema. Restriksijske mešanice (proge A-F) in DNA lestvico (proga X) smo nanesli na 1 % agarozni gel. Kontrolne restrikcije smo izvedli z restriksijskimi encimi navedenimi v Preglednici 21, v kateri so navedena tudi imena DNA konstruktov skupaj s pričakovanimi dolžinami fragmentov.

Preglednica 21: Restriksijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala z dvema represorjema ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.

Oznaka na agaroznem gelu	Ime DNA konstrukta	Restriksijski encimi	Pričakovane dolžine DNA fragmentov
X	DNA lestvica GeneRuler™ 1kbp DNA Ladder		
A	PIR-CMV-TALB:KRAB	<i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I	4488 bp, 2470 bp, 882 bp, 417 bp
B	ETR-CMV-TALA:KRAB	<i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I	5460 bp, 2470 bp, 417 bp
C	Pip:KRAB	<i>Spe</i> I in <i>Xba</i> I	4712 bp, 1275 bp, 664 bp
D	E:KRAB	<i>Spe</i> I in <i>Xba</i> I	4712 bp, 1080 bp, 664 bp
E	[10XA]-pCMV-TALB:KRAB-t2A-BFP	<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III in <i>Xba</i> I	4637 bp, 3697 bp, 1334bp, 49 bp, 12 bp
F	[10XB]-pCMV-TALA:KRAB-t2A-mCitrine	<i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III in <i>Xba</i> I	4637 bp, 3697 bp, 1334bp, 49 bp

4.3.3 Testiranje inducibilnih sistemov na osnovi represorjev TAL

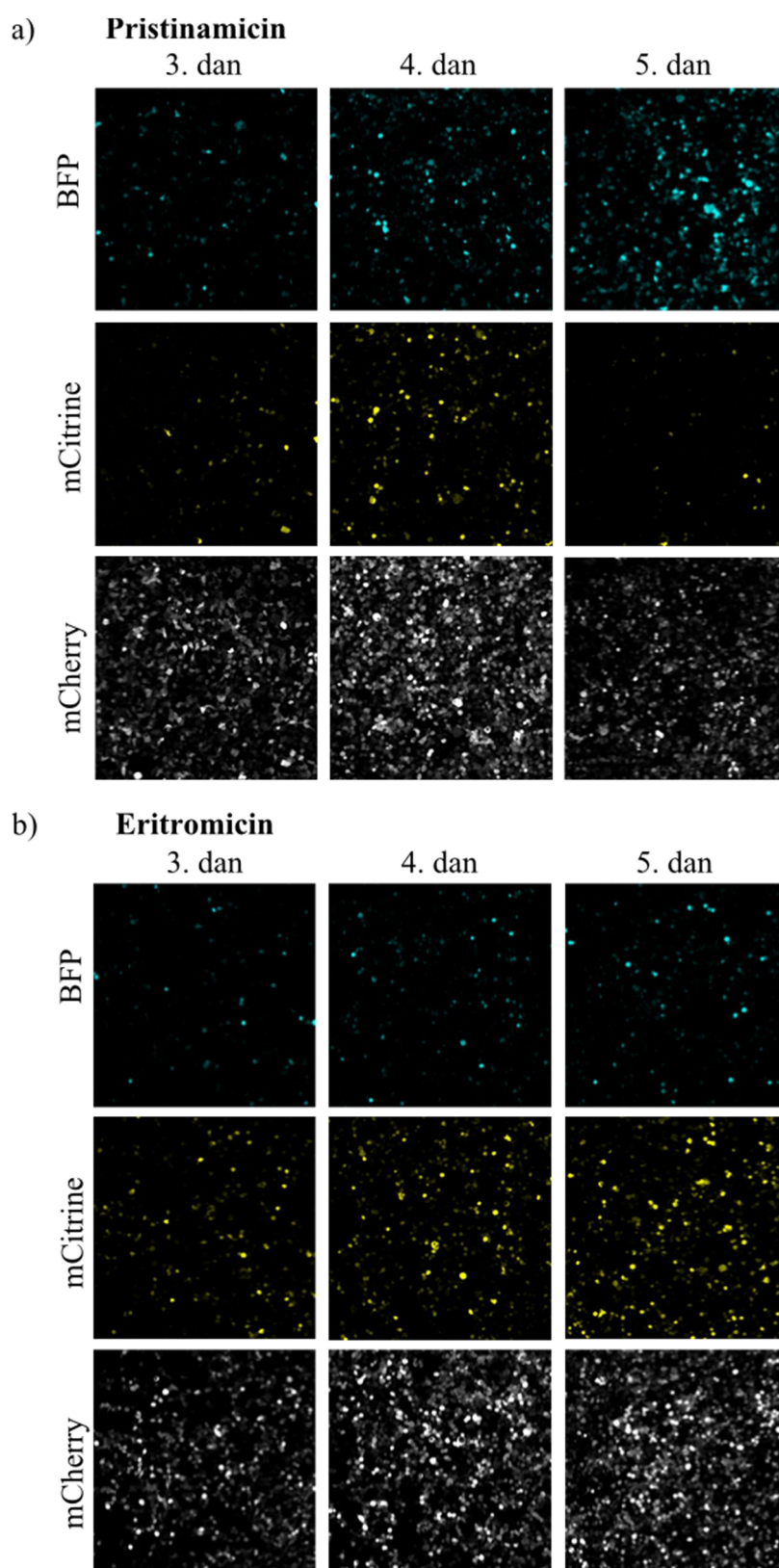
Ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom smo želeli doseči čim boljše inhibicijo poročevalskega gena fLuc z represorji TAL, katerih izražanje nadzirajo inducibilni represorji (Pip:KRAB ali E:KRAB). V celice človeške linije HEK293T smo s prehodno transfekcijo vstavili plazmide navedene v Prilogi F. Tri dni po stimulaciji z antibiotikom (pristinamicinom oziroma eritromicinom) smo lizirali celice in izmerili luciferazno aktivnost po protokolu opisanem v poglavju Materiali in metode. Rezultati kažejo, da smo ob indukciji s pristinamicinom dosegli do 60 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena, ob indukciji z eritromicinom pa tudi do 80 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena (Slika 31b).



Slika 31: Inhibicija izražanja poročevalskega gena fLuc z represorjem TALB oziroma TALA ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom v odvisnosti od količine inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB v človeških celicah HEK293T. (a) Shema izvedbe eksperimenta. Stimulacija s pristinamicinom (PI) prepreči vezavo inducibilnega represorja Pip:KRAB na vezavno mesto PIR, kar vodi v izražanje represorja TALB in posledično inhibicijo izražanja poročevalskega gena fLuc. Stimulacija z eritromicinom (EM) prepreči vezavo inducibilnega represorja E:KRAB na vezavno mesto ETR, kar vodi v izražanje represorja TALA in posledično inhibicijo izražanja poročevalskega gena fLuc. (b) Graf prikazuje primerjavo med stimuliranimi celicami (rožnati oziroma vijolični stolpci) in nestimuliranimi celicami (sivi stolpci). Predpostavili smo maksimalno izražanje poročevalskega gena v odsotnosti induktorja.

4.3.4 Testiranje stikala s konfokalno mikroskopijo

Delovanje stikala smo želeli testirati s konfokalno mikroskopijo, ki nam je omogočila spremljanje stanja stikala v posamezni celici preko fluorescence. Celice človeške linije HEK293T smo prehodno transficirali s plazmidi, ki so del preklopnega stikala (Slika 27). Natančne količine plazmidov so navedene v Prilogi H. Ob transfekciji smo v gojišče dodali ustrezen induktor. Stanje genskega stikala v celicah smo nato spremljali s konfokalno mikroskopijo po protokolu opisanem v poglavju Materiali in metode. Stanje stikala smo pričeli spremljati tretji dan po transfekciji in ga spremljali do 6 dni. Spremljali smo tri fluorescentne proteine, in sicer mCherry (kontrola uspešnosti transfekcije), BFP (stanje 1) ter mCitrine (stanje 2). Zanimali sta nas indukcija stanja 1 (BFP) s pristinamicinom in indukcija stanja 2 (mCitrine) z eritromicinom. Rezultati so pokazali, da preklopno stikalo z dvema represorjema niti ob stimulaciji s pristinamicinom niti z eritromicinom ne zavzame zelenega stanja.



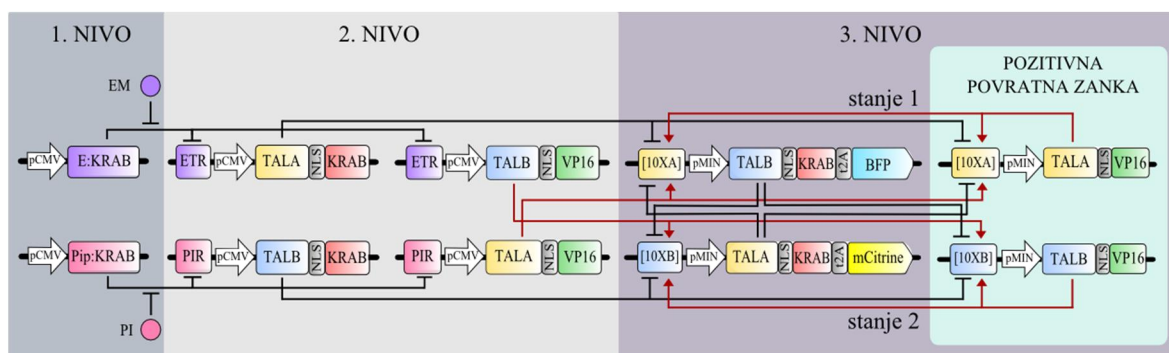
Slika 32: Spremljanje preklpnega stikala z dvema represorjema v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom. (a) Spremljanje stikala ob konstantno dodanem induktorju pristinamicinu (b) Spremljanje stikala ob konstantno dodanem induktorju eritromicinu.

4.4 PREKLOPNO STIKALO S POZITIVNO POVRATNO ZANKO

Stikalo pripravljeno na enak način kot stikala opisana v literaturi, le preko uporabe represorjev TAL, ni uspešno delovalo. Matematične analize genskih stikal so pokazale, da je za doseg bistabilnosti potrebna nelinearna kooperativnost genskih elementov (Cherry in Adler, 2000). Težava je, da se efektorji TAL na tarčno DNA vežejo kot monomeri (Mak in sod., 2012), zato je kooperativnost njihove vezave nizka. Z računalniškimi modeli pripravljenimi tekom projekta iGEM 2012 (Modelling – mutual ..., 2012) smo pokazali, da je preklopno stikalo z dvema represorjema nestabilno prav zaradi nizke kooperativnosti represorjev TAL. Matematično rešitev so ponudili Macía in sod. (2009) ter Widder in sod. (2009), ki so predpostavili, da bistabilnost v genskem stikalu lahko dosežemo tudi z nekooperativnimi elementi, v primeru da v sistem vnesemo nelinearnost odziva. To bi lahko dosegli z uporabo transkripcijskega faktorja, ki bi hkrati aktiviral izražanje samega sebe in inhibiral izražanje nasprotnega represorja. V literaturi takšnih transkripcijskih faktorjev nismo našli, kar je najverjetneje tudi razlog, da gensko stikalo na osnovi nekooperativnih transkripcijskih faktorjev eksperimentalno še ni bilo izvedeno. Po premisleku smo prišli do rešitve tega problema. V primeru preklopnega stikala z dvema represorjema smo zasnovo sistema spremenili tako, da smo uvedli dodatek dveh aktivatorjev TAL z enakima DNA vezavnima domenama kot jih imata uporabljena represorja TAL. S tem v sistem uvedemo pozitivno povratno zanko, kar bi lahko omogočilo stabilnost stikala. V primeru preklapljanja med stanjema bi prišlo do tekmovanja represorja in aktivatorja za isto vezavno mesto.

4.4.1 Zasnova in delovanje stikala

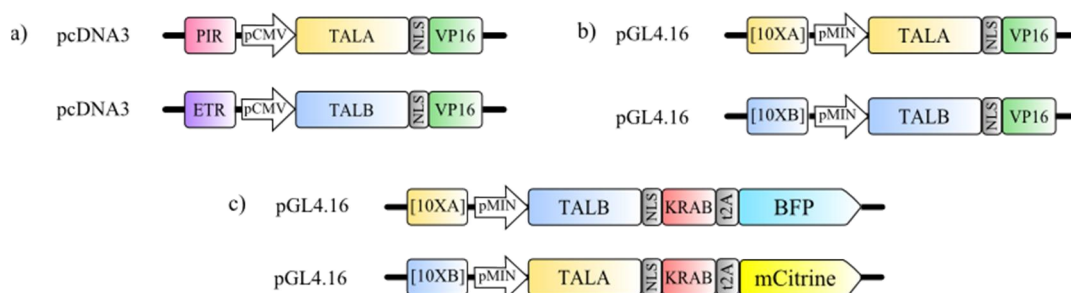
Preklopno stikalo z dvema represorjema smo nadgradili in izboljšali z dodatkom pozitivne povratne zanke sestavljene iz aktivatorjev TAL, ki z represorji TAL tekmujejo za skupno vezavno mesto. Za izražanje genov v stikalu smo tokrat namesto konstitutivnega promotorja uporabili minimalni promotor (pMIN) z zanemarljivim puščanjem in s tem povečali robustnost stikala. Zaradi uporabe minimalnega promotorja, smo inducibilnima sistemoma poleg represorjev TAL dodali še aktivatorja TAL odgovorna za aktivacijo transkripcije inducirane stanja. Shema preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko je prikazana na sliki 33.



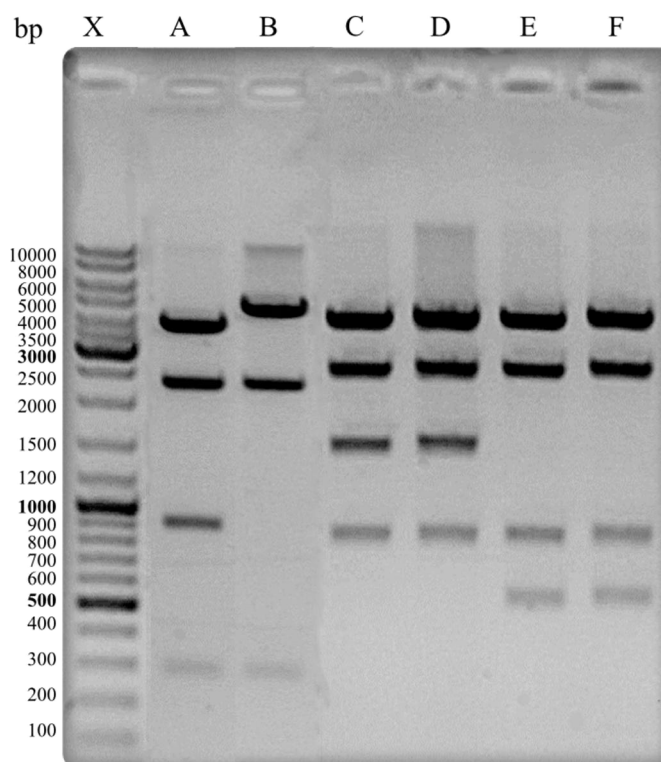
Slika 33: Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko, sestavljeno iz treh nivojev. Prvi nivo vsebuje inducibilne represorje (E:KRAB in Pip:KRAB), ki v odvisnosti od induktorja, pristinamicina (PI) ali eritromicina (EM), uravnavajo izražanje represorjev in aktivatorjev TAL v drugem nivoju. Le-ti z vezavo na tarčna vezavna mesta v tretjem nivoju inhibirajo oziroma aktivirajo izražanje tarčnega stanja. V tretjem nivoju se nahajata represorja TAL in TALB, ki inhibirata izražanje drug drugega. Vsak izmed njiju je s peptidom t2A povezan s poročevalskim fluorescentnim proteinom (BFP ali mCitrine), kar omogoča spremljanje stanja stikala. Za razliko od preklopnega stikala z dvema represorjema je poleg represorjev TAL z medsebojno inhibicijo dodana še pozitivna povratna zanka sestavljena iz aktivatorjev TAL in TALB.

4.4.2 Priprava konstruktov

Pripravili smo aktivatorja TAL pod kontrolo minimalnega promotorja, ki sta v stikalu sestavljala pozitivno povratno zanko (Slika 34b). Inducibilna sistema smo nadgradili z dodatkom aktivatorjev TAL pod kontrolo konstitutivnega promotorja (pCMV), pred katerim so se nahajala vezavna mesta za represorski protein Pip:KRAB (PIR) ali E:KRAB (ETR) (Slika 34a). Za spremljanje stanj stikala smo enako kot pri preklopnem stikalu z dvema represorjema uporabili modri fluorescentni protein BFP in rumeni fluorescentni protein mCitrine, ki sta bila preko peptida t2A povezana z represorjema TAL (Slika 34c). Razlika je, da so bili le-ti tokrat pod kontrolo minimalnega in ne konstitutivnega promotorja. DNA konstrukti so bili pripravljene po metodah molekularnega kloniranja (opisano v poglavju Materiali in metode) med projektom iGEM 2012, pri čemer je sodelovalo več članov ekipe. Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 35) in s sekvenciranjem (Priloga A in B). Kot je razvidno iz slike gela (Slika 35), vse dolžine DNA fragmentov ustrezajo pričakovanim dolžinam.



Slika 34: DNA konstrukti za preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko. (a) Aktivatorji TAL pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV) pred katerim se nahajajo vezavna mesta za inducibilni represor Pip:KRAB (PIR) ali E:KRAB (ETR). (b) Shemi plazmidov z zapisom za aktivatorja TAL pod nadzorom minimalnega promotorja (pMIN), pred katerim se nahajajo vezavna mesta za transkripcijske faktorje TAL. (c) Shemi plazmidov, ki vsebujeta zapis za represor TAL in fluorescentni protein (BFP ali mCitrine), povezana s peptidom t2A. Oba plazmida vsebujeta minimalni promotor (pMIN) pred katerim se nahajajo vezavna mesta za TAL.



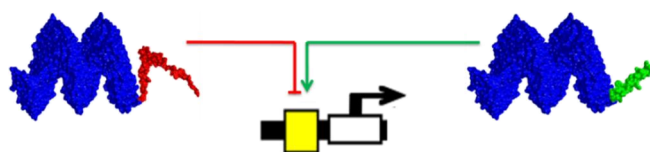
Slika 35: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko. Restriksijske mešanice (proge A-F) in DNA lestvico (proga X) smo nanesli na 1 % agarozni gel. Kontrolne restrikcije smo izvedli z restriksijskimi encimi navedenimi v Preglednici 22, v kateri so navedena tudi imena DNA konstruktov skupaj s pričakovanimi dolžinami fragmentov.

Preglednica 22: Restriksijski encimi uporabljeni za kontrolne restrikcije DNA konstruktov uporabljenih za pripravo preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko ter pričakovane dolžine DNA fragmentov.

Oznaka na agaroznem gelu	Ime DNA konstrukta	Restriksijski encimi	Pričakovane dolžine DNA fragmentov
X	DNA lestvica GeneRuler™ 1kbp DNA Ladder		
A	PIR-CMV-TALA:VP16	<i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I	4488 bp, 2470 bp, 882 bp, 270 bp
B	ETR-CMV-TALB:VP16	<i>Bam</i> HI in <i>Xba</i> I	5460 bp, 2470 bp, 270 bp
C	[10XA]-pMIN-TALB:KRAB-t2A-BFP	<i>Eco</i> RI in <i>Bam</i> HI	3852 bp, 2439 bp, 1424 bp, 793 bp
D	[10XB]-pMIN-TALA:KRAB-t2A-mCitrine	<i>Eco</i> RI in <i>Bam</i> HI	3852 bp, 2439 bp, 1429 bp, 793 bp
E	[10XA]-pMIN-TALA:VP16	<i>Eco</i> RI in <i>Bam</i> HI	3852 bp, 2439 bp, 793 bp, 515bp
F	[10XB]-pMIN-TALB:VP16	<i>Eco</i> RI in <i>Bam</i> HI	3852 bp, 2439 bp, 793 bp, 515bp

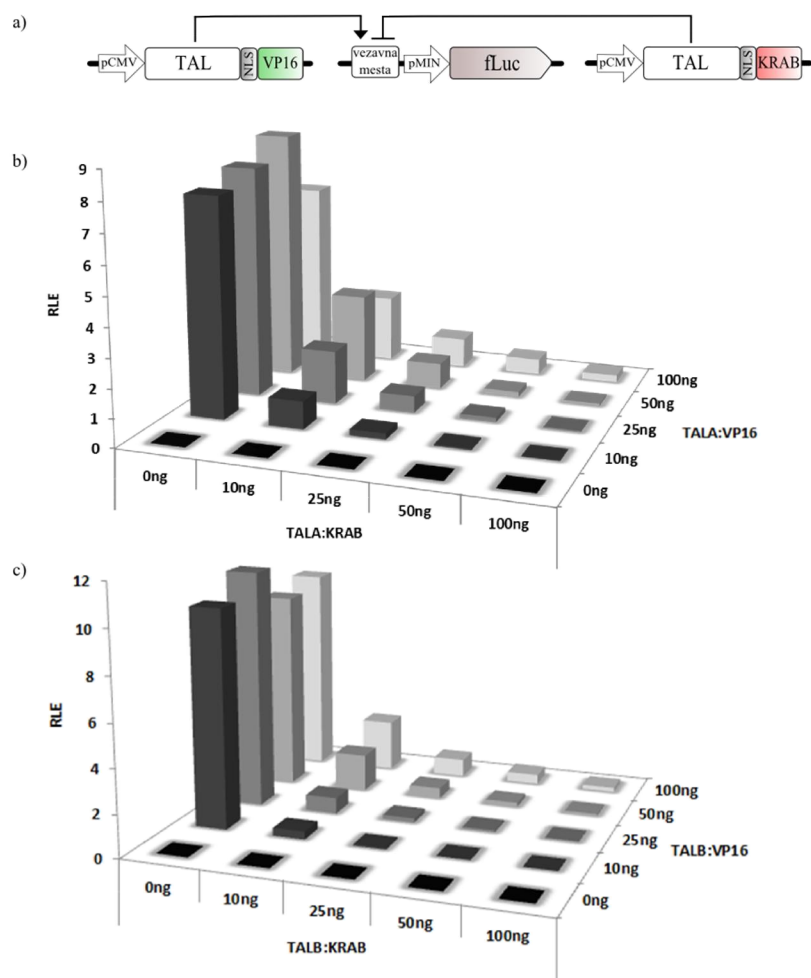
4.4.3 Tekmovanje med represorjem in aktivatorjem

Za preklon stikala iz enega v drugo stanje je potrebno tekmovanje med represorji in aktivatorji za skupna vezavna mesta (Slika 36). Zaradi slabo poznanih mehanizmov delovanja efektorskih domen (VP16 ter KRAB), nismo vedeli kakšen je rezultat izražanja gena, če se na njegov operator hkrati lahko vežeta kot represor kot aktivator.



Slika 36: Represor TAL (desno) in aktivator TAL (levo) tekujeta za skupno vezavno mesto, ki se nahaja pred izbranim genom (Positive feedback ..., 2012).

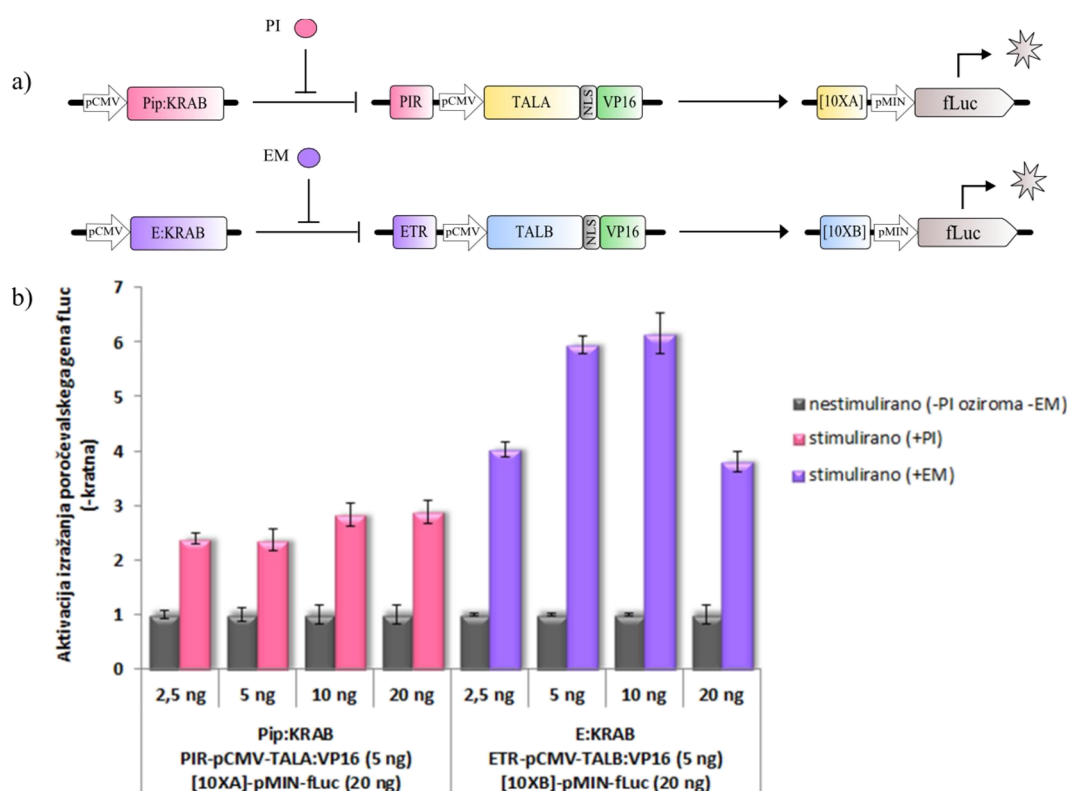
Želeli smo preveriti kako se obnaša sistem, če sta hkrati prisotna represor in aktivator, ki tekujeta za isto vezavno mesto. Za zasnovo eksperimentov je potrebno, da vemo kakšna količina aktivatorja je potrebna, da le-ta prevladuje nad represorjem oziroma obratno. Celice človeške linije HEK293T smo hkrati transficirali z represorjem TALA in aktivatorjem TALA oziroma represorjem TALB in aktivatorjem TALB ter poročevalskim plazmidom s pripadajočimi vezavnimi mesti pred minimalnim promotorjem (pMIN). Količine plazmidov so navedene v prilogi I. Luciferazno aktivnost (poglavje Materiali in metode) smo izmerili tri dni po transfekciji. Rezultate smo uporabili v računalniškem modelu (rezultati niso prikazani), s katerim smo si pomagali pri načrtovanju preklopnega stikala. Iz rezultatov sklepamo, da represor prevlada nad aktivatorjem, saj se že pri najnižji količini represorja, aktivacija izražanja poročevalskega gena zmanjša tudi za več kot 80 odstotkov (Slika 37b in c).



Slika 37: Tekmovanje za vezavna mesta med aktivatorjem in represorjem TAL v človeških celicah HEK293T. (a) Shema izvedbe eksperimenta. Vezavna mesta za katera tekmujeta aktivator in represor TAL se nahajajo pred minimalnim promotorjem (pMIN), ki uravnava izražanje poročevalskega gena fLuc. (b) Graf prikazuje vpliv razmerij med aktivatorjem TALA in represorjem TALA na izražanje poročevalskega gena fLuc. Standardni odkloni so navedeni v prilogi I. (c) Graf prikazuje vpliv razmerij med aktivatorjem TALB in represorjem TALB na izražanje poročevalskega gena fLuc. Standardni odkloni so navedeni v prilogi I.

4.4.4 Testiranje inducibilnih sistemov na osnovi aktivatorjev TAL

Ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom smo želeli doseči čim boljše aktivacijo poročevalskega gena fLuc z aktivatorji TAL, katerih izražanje nadzirajo inducibilni represorji (Pip:KRAB ali E:KRAB). V človeške celice HEK293T smo s prehodno transfekcijo vnesli plazmide navedene v prilogi G. Tri dni po stimulaciji z antibiotikom (pristinamicinom ali eritromicinom) smo celice lizirali in izmerili luciferazno aktivnost po protokolu opisanem v poglavju Materiali in metode. Rezultati kažejo, da smo ob indukciji s pristinamicinom dosegli do 3-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena, ob indukciji z eritromicinom pa tudi več kot 6-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena (Slika 38b).

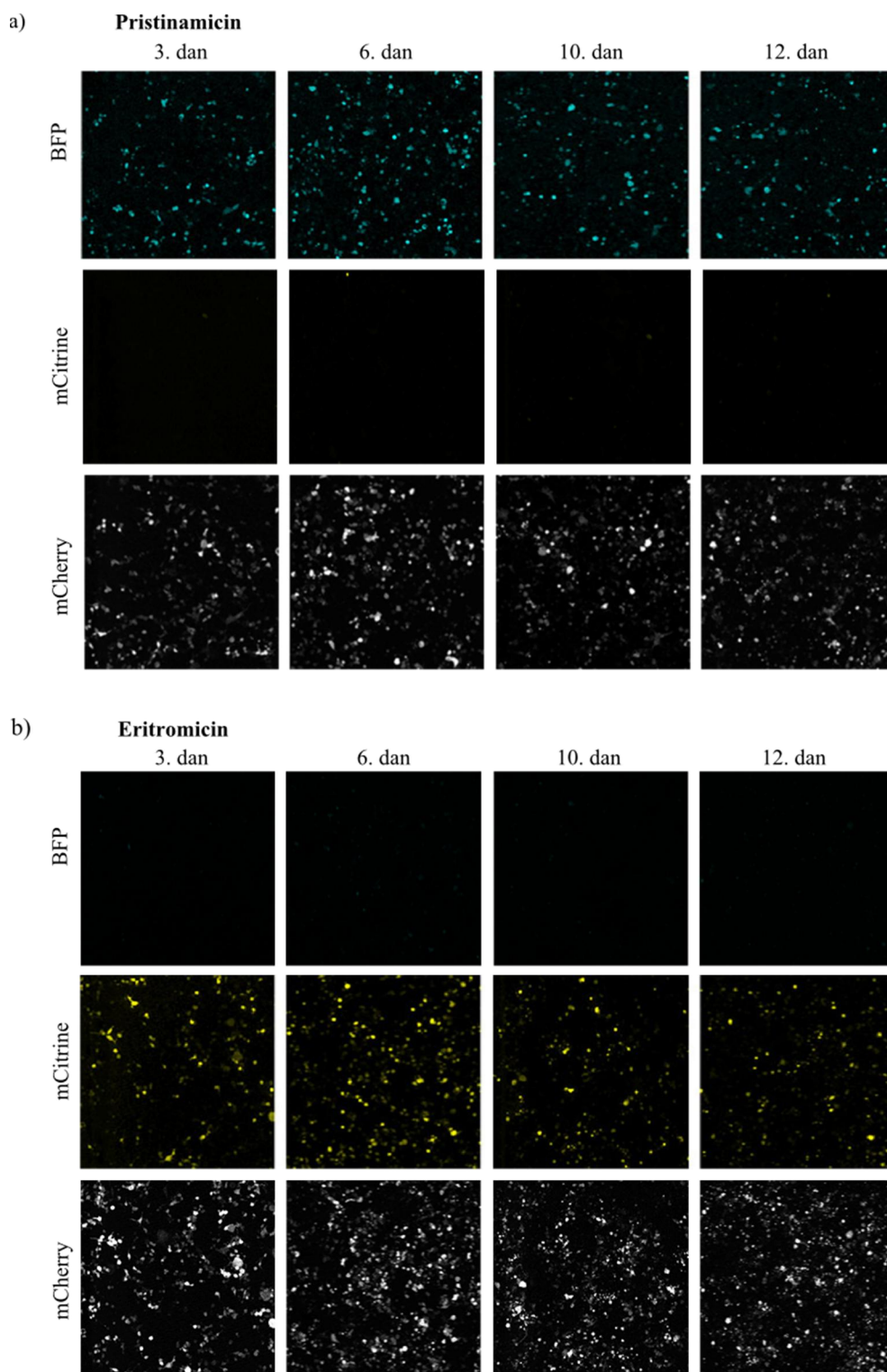


Slika 38: Aktivacija izražanja poročevalskega gena fLuc z aktivatorjem TALA oziroma TALB ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom v odvisnosti od količine inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB. (a) Stimulacija s pristinamicinom (PI) prepreči vezavo inducibilnega represorja Pip:KRAB na vezavno mesto PIR kar vodi v izražanje aktivatorja TALA, ki sproži transkripcijo poročevalskega gena fLuc. Stimulacija z eritromicinom (EM) prepreči vezavo inducibilnega represorja E:KRAB na vezavno mesto ETR kar vodi v izražanje aktivatorja TALB, ki sproži transkripcijo poročevalskega gena fLuc. (b) Graf prikazuje primerjavo med stimuliranimi celicami (vijolični stolpci) in nestimuliranimi celicami (sivi stolpci). Rezultate smo normalizirali na izražanje poročevalskega gena v odsotnosti induktorja.

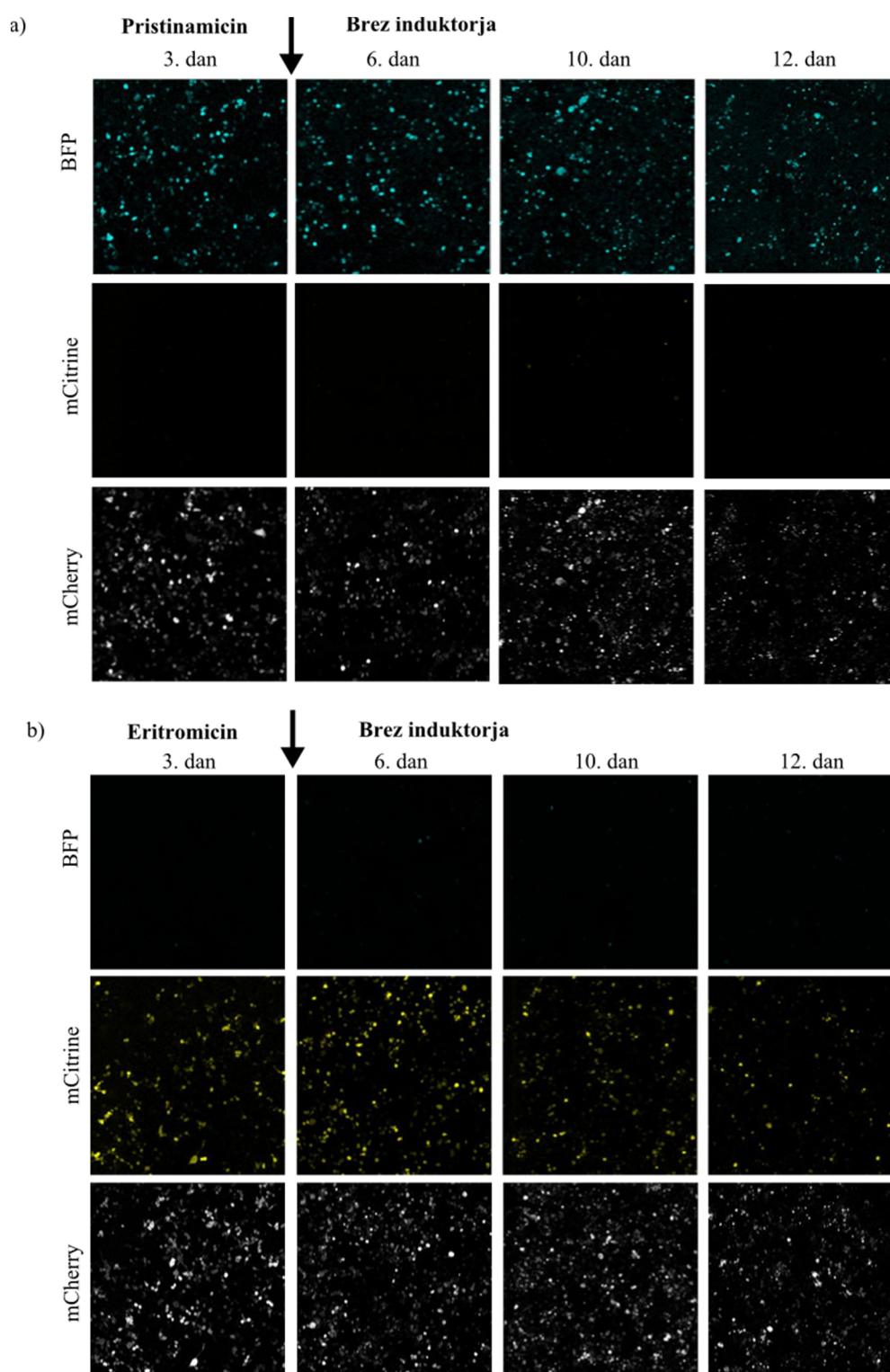
4.4.5 Testiranje stikala s konfokalno mikroskopijo

Delovanje stikala smo želeli testirati s konfokalno mikroskopijo, ki nam je omogočila spremljanje stanja stikala v posamezni celici preko fluorescence. Celice človeške linije HEK293T smo prehodno transficirali s plazmidi prikazanimi na sliki 33. Količine transficiranih plazmidov so navedene v Prilogi J. Stanje stikala smo spremljali s konfokalno mikroskopijo (protokol opisan v poglavju Materiali in metode). Stikalo smo pričeli spremljati tretji dan po transfekciji in ga spremljali do dvanajstega dne. Tretji dan smo celicam zamenjali gojišče in odstranili ali dodali ustrezen antibiotik. Zanimalo nas je: i) indukcija stanja 1 (BFP) s pristinamicinom in indukcija stanja 2 (mCitrine) z eritromicinom, ii) ohranitev stabilnega stanja po odstranitvi induktorja ter iii) preklop iz stanja 1 v stanje 2 in obratno z menjavo induktorja. Spremljali smo tri fluorescentne proteine, in sicer mCherry (kontrola uspešnosti transfekcije), BFP (stanje 1) in mCitrine (stanje 2). Iz rezultatov je razvidno, da stikalo ob konstantno dodanem induktorju (pristinamicin ali eritromicin) zavzame želeno stanje (Slika 39), ki ga ohrani tudi po

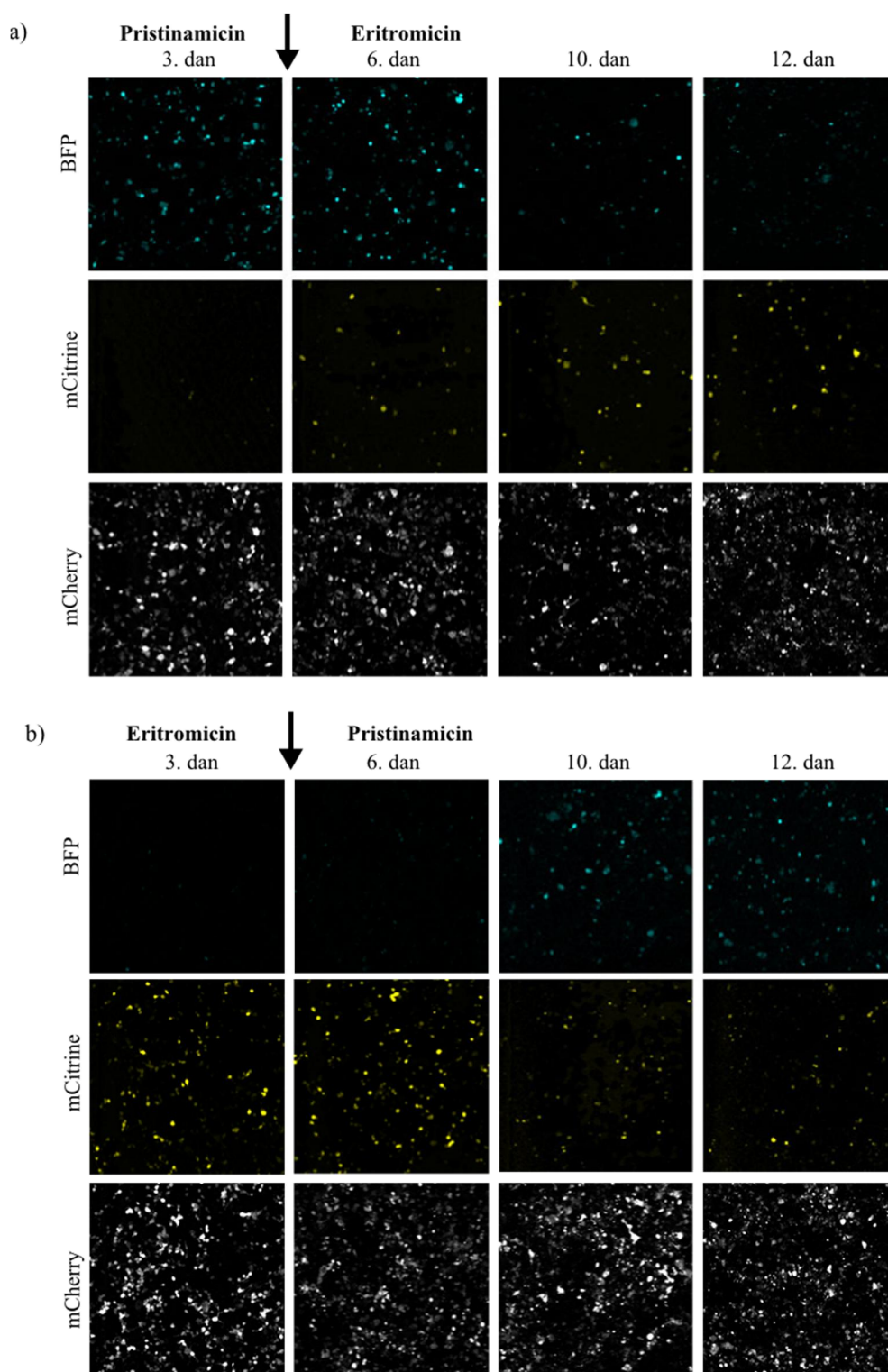
odstranitvi induktorja (Slika 40). Hkrati smo pokazali, da je možen prekop iz enega v drugo stanje stikala (Slika 41).



Slika 39: Spremljanje prekopnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom ob konstantno dodanem induktorju. (a) Spremljanje stikala ob konstantno dodanem induktorju pristinamicinu. (b) Spremljanje stikala ob konstantno dodanem induktorju eritromicinu.



Slika 40: Spremljanje preklpnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom po odstranitvi induktorja. (a) Spremljanje stikala po odstranitvi induktorja pristinamicina. (b) Spremljanje stikala po odstranitvi induktorja eritromicina.



Slika 41: Spremljanje preklopa preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko v človeških celicah HEK293T s konfokalnim mikroskopom po zamenjavi induktorja. (a) Tretji dan po transfekciji zamenjava pristinamicina za eritromicin ter spremljanje preklopa iz stanja 1 (BFP) v stanje 2 (mCitrine). (b) Tretji dan po transfekciji zamenjava eritromicina za pristinamicin ter spremljanje preklopa iz stanja 2 (mCitrine) v stanje 1 (BFP).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Biološko računalništvo je ena izmed vej sintezne biologije, ki je še na začetku svojega razvoja. Do sedaj so sintetična genska stikala temeljila predvsem na naravnih prokariotskih transkripcijskih faktorjih (Gardner in sod., 2000; Kramer in sod., 2004b; Greber in sod., 2008). Njihovo število je omejeno, poleg tega pa lahko nepričakovano interagirajo z endogenimi celičnimi komponentami ter z drugimi vnesenimi prokariotskimi transkripcijskimi faktorji. Do sedaj uporabljeni transkripcijski faktorji imajo tudi zelo raznolike biokemijske lastnosti, zato morajo biti za uporabo v genskih omrežjih dobro okarakterizirani. Cilj te magistrske naloge je bil pripraviti gensko stikalo, ki temelji na sintetičnih, ortogonalnih transkripcijskih faktorjih. Do danes so bili že pripravljeni različni sintetični transkripcijski faktorji, ki temeljijo na modularnih DNA vezavnih proteinih, kot so na primer cinkovi prsti (Beerli in sod., 1993) in efektorji TAL (Garg in sod., 2012). Za namene magistrske naloge smo izbrali pred kratkim odkrite efektorje TAL. Umetno gensko-regulatorno omrežje, kot je na primer preklopno stikalo, ki bi temeljilo na modularnih, ortogonalnih elementih, po naših podatkih eksperimentalno še ni bilo izvedeno.

5.1.1 Izbira DNA vezavnih domen

Za specifično vezavo na tarčna mesta so se zadnji dve desetletji uporabljali predvsem sintetični DNA vezavni proteini, imenovani cinkovi prsti. Kljub razvoju tehnologije cinkovih prstov, sintetični cinkovi prsti niso najbolj primerni za tarčno ciljanje kateregakoli nukleotidnega zaporedja, saj posamezni cinkovi prsti lahko vplivajo na afiniteto vezave sosednjih prstov (Ramirez in sod., 2008). Pred kratkim so odkrili DNA vezavne proteine, imenovane efektorji TAL, s precej bolj enostavno kodo za prepoznavo DNA (Boch in sod., 2009; Moscou in Bogdanove, 2009). DNA vezavne domene efektorjev TAL so sestavljene iz ponovitev s skoraj identičnim zaporedjem, ki se med seboj razlikujejo le v dveh aminokislinah (RVD), odgovornih za vezavo na tarčni nukleotid (Deng in sod., 2012; Mak in sod., 2012). Takšna modularna struktura nam omogoča pripravo številnih sintetičnih DNA vezavnih domen za vezavo na poljubna tarčna mesta, kar pomeni, da lahko načrtujemo takšne DNA vezavne domene, ki se ne vežejo na zaporedja v genomski DNA in tako ne interagirajo z endogenimi celičnimi procesi. Hkrati to zagotavlja tudi širok nabor DNA vezavnih domen z različno specifičnostjo. V nasprotju z naravnimi bakterijskimi transkripcijskimi faktorji so efektorji TAL ortogonalni in imajo podobne biokemijske lastnosti, zaradi česar lahko lažje predvidimo njihovo obnašanje v načrtovanih gensko-regulatornih omrežjih. V magistrski nalogi smo se odločili za uporabo sintetičnih DNA vezavnih domen efektorjev TAL, ki smo jih izbrali iz literature (Sander in sod., 2011).

5.1.2 Učinkovitost in specifičnost vezave sintetičnih transkripcijskih faktorjev TAL

DNA vezavni domeni TALA in TALB smo povezali z represorsko domeno KRAB (Slika 22a) ter aktivatorsko domeno VP16 (Slika 22b) in tako pripravili umetne transkripcijske

faktorje na osnovi ortogonalnih elementov, podobno kot so to storili Garg in sod. (2012). Predhodno smo ugotovili (TAL-based ..., 2012), da je za doseg najvišje stopnje inhibicije poročevalskega gena optimalno število ponovitev vezavnih mest za sintetično pripravljene transkripcijske faktorje TAL sedem ali več, zato smo za nadaljnje eksperimente uporabili deset ponovitev vezavnih mest.

Za testiranje represorjev TAL smo pripravili poročevalske plazmide, ki so vsebovali 10 ponovitev vezavnih mest za represorje TAL, konstitutivni promotor (pCMV) ter poročevalski gen fLuc (Slika 22c). Testirali smo različne količine represorjev TAL z represorsko domeno KRAB na C-terminalnem koncu, N-terminalnem koncu ter na obeh terminalnih koncih hkrati. Z represorji smo ne glede na pozicijo domene KRAB dosegli več kot 90 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena, kar dokazuje, da sta TALA in TALB učinkovita sintetična transkripcijska represorja (Slika 24b). Najbolje se je sicer izkazala oblika represorja TAL z dvema kopijama represorske domene KRAB, s katero smo dosegli kar 98 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena. Želeli smo preveriti tudi, če se represorja specifično vežeta na svoja vezavna mesta. Medsebojna ortogonalnost represorjev TAL je pomembna, saj je za učinkovito delovanje genskega stikala ključno specifično uravnavanje izražanja genov. Iz grafa (Slika 25b) je razvidno, da se nivo izražanja poročevalskega gena fLuc ohranja v primeru, da so prisotna vezavna mesta za nasprotni represor. Iz tega lahko sklepamo, da ne pride do nespecifične vezave represorjev TALA in TALB na nasprotna vezavna mesta, kar pomeni da sta si represorja TAL med seboj ortogonalna. Iz neznanega razloga se nivo izražanja poročevalskega gena nekoliko zniža le v primeru represorja TALA z represorsko domeno KRAB na obeh terminalnih koncih, zato smo se za namene magistrske naloge za nadaljnje eksperimente odločili uporabiti represorja TAL z represorsko domeno na C-terminalnem koncu.

Za testiranje aktivatorjev TAL smo pripravili poročevalske plazmide, ki so vsebovali 10 ponovitev vezavnih mest za aktivatorje TAL, minimalni promotor (pMIN) ter poročevalski gen fLuc (Slika 22c). Z merjenjem luciferazne aktivnosti smo preverili ali pride do specifične vezave aktivatorjev TAL na vezavna mesta ter posledično do aktivacije transkripcije poročevalskega gena. Testirali smo različne količine aktivatorjev TAL z aktivatorsko domeno VP16 na C-terminalnem koncu. Najvišji nivo aktivacije izražanja poročevalskega gena smo tako z aktivatorjem TALA kot z aktivatorjem TALB dosegli, kadar je bilo razmerje med poročevalskim plazmidom in aktivatorjem TAL 4:1 (Slika 26b). Z aktivatorjem TALA smo pri takem razmerju plazmidov dosegli aktivacijo izražanja poročevalskega za približno faktor 600, medtem ko smo z aktivatorjem TALB dosegli aktivacijo izražanja poročevalskega gena za približno faktor 3000. S tem pokazali, da sta TALA in TALB učinkovita sintetična transkripcijska aktivatorja. Preverili smo tudi, če se aktivatorja TALA in TALB specifično vežeta na svoja vezavna mesta, s čimer smo želeli dodatno potrditi njuno medsebojno ortogonalnost. Iz grafa (Slika 26b) je razvidno, da aktivatorji TALA oziroma TALB ne sprožijo transkripcije poročevalskega gena fLuc, če so prisotna le vezavna mesta za nasprotni aktivator TAL, iz česar lahko sklepamo, da ne pride do nespecifične vezave. S tem smo potrdili, da sta tudi aktivatorja TAL medsebojno ortogonalna.

Poročevalski plazmid brez dodanega aktivatorja smo pri eksperimentu uporabili kot kontrolo, hkrati pa pokazali, da v odsotnosti aktivatorja ne pride do izražanja

poročevalskega gena fLuc (Slika 26b). Zaradi takšnega minimalnega puščanja je minimalni promotor odličen element za pripravo gensko-regulatornih omrežij, kot so na primer preklopna stikala, kjer je nujno potrebno natančno uravnavanje izražanja genov.

5.1.3 Preklopno stikalo z dvema represorjema

Po zgledu Gardner in sod. (2000) ter Kramer in sod. (2004b) smo pripravili preklopno stikalo z dvema represorjema (Slika 27), ki namesto na bakterijskih transkripcijskih represorjih temelji na ortogonalnih sintetičnih represorjih TAL z medsebojno inhibicijo.

5.1.3.1 Inducibilni sistemi na osnovi represorjev TAL

Cilj magistrske naloge je bil pripraviti gensko preklopno stikalo, ki ga je moč uravnavati z zunanjimi signali. Za to smo potrebovali dva različna induktorja, ki omogočata indukcijo enega ali drugega stanja v genskem stikalu. Odločili smo se, da uporabimo dva že okarakterizirana inducibilna sistema Pip_{ON} (Fussenegger in sod., 2000) ter E_{ON} (Weber in sod., 2002) za uporabo v sesalskih celicah. Pri obeh sistemih (natančno opisana v poglavju 2.3.1) so pokazali, da indukcija z ustreznim induktorjem prepreči vezavo inducibilnega represorja na vezavna mesta pred poročevalskim genom, kar vodi v izražanje poročevalskega gena. Za namene magistrske naloge smo šli korak dlje in pripravili dvo nivojski sistem uravnavanja izražanja genov. Z uporabo metod molekularnega kloniranja smo tako sistem Pip_{ON} kot sistem E_{ON} prilagodili za naše potrebe tako, da se je ob dodatku induktorja sprožilo izražanje represorjev TAL, ki so z vezavo na tarčna vezavna mesta inhibirali izražanje poročevalskega gena fLuc (Slika 31a).

Želeli smo določiti optimalno količino inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB, s katero lahko dosežemo maksimalno inhibicijo poročevalskega gena fLuc preko represorjev TAL ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom. Za testiranje sistema smo uporabili poročevalski plazmid, ki je vseboval poročevalski gen pod nadzorom konstitutivnega promotorja (pCMV) pred katerim so se nahajala vezavna mesta za represorje TAL. V obeh primerih, tako ob stimulaciji s pristinamicinom kot z eritromicinom, smo najvišji nivo inhibicije izražanja poročevalskega gena dosegli z represorskim proteinom Pip:KRAB oziroma E:KRAB ter plazmidom z zapisom za represorje TAL v razmerju 2:1. Ob stimulaciji s pristinamicinom smo dosegli do 60 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena (Slika 31b), ob stimulaciji z eritromicinom pa tudi do 80 odstotno inhibicijo (Slika 31b).

5.1.3.2 Delovanje preklopnega stikala z dvema represorjema

Preklopno stikalo, ki smo ga pripravili (Slika 27), je moč nadzorovati z dvema induktorjema, pristinamicinom in eritromicinom. V odvisnosti od induktorja naj bi stikalo zavzelo enega izmed dveh stabilnih stanj. Predpostavili smo, da se bo ob indukciji s pristinamicinom induciralo stanje 1 (BFP), ob indukciji z eritromicinom pa stanje 2 (mCitrine). Iz slike 32 je razvidno, da preklopno stikalo z dvema represorjema ob indukciji s pristinamicinom ali eritromicinom ne zavzame želenega stanja. V obeh primerih se

stikalo sicer prevesi na stran inducirane stanja, a se poleg tega izraža tudi drugo stanje. Kramer in sod. (2004b) so poročali o puščanju konstitutivnega promotorja, zaradi česar v zaprtem stanju stikala niso uspeli doseči popolne inhibicije izražanja poročevalskega gena. Hkrati je bila tudi aktivacija izražanja poročevalskega gena v odprtem stanju stikala zaradi puščanja precej nizka. Preverili smo, če represorji TAL v drugem nivoju učinkovito inhibirajo tarčno stanje (rezultati niso prikazani). Ugotovili smo, da do popolne inhibicije tarčnega stanja ne pride, kar pomeni, da stikalo ni robustno in verjetno deluje le v zelo ozkem območju parametrov. Sklepamo lahko, da je nepopolna inhibicija konstitutivnega promotorja eden izmed razlogov, ki stikalu onemogoča zasedbo stabilnega stanja. Tudi računalniški modeli pripravljeni tekom projekta iGEM 2012 (Modelling – mutual ..., 2012) so pokazali visoko občutljivost preklopnega stikala na puščanje promotorja.

5.1.4 Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko

Cherry in Adler (2000) so kot predpogoj za doseg bistabilnosti predpostavili visoko kooperativnost represorjev, kar so pokazale tudi stohastične simulacije, pripravljene med projektom iGEM 2012 (Modelling – mutual ..., 2012). Efektorji TAL se na DNA vežejo kot monomeri (Mak in sod., 2012), zato je njihova kooperativnost vezave nizka. V magistrski nalogi smo z uporabo efektorjev TAL pripravili pare represorjev in aktivatorjev, ki tekmujejo za skupna vezavna mesta in s tem v sistem vnesli nelinearnost.

Preklopno stikalo z dvema represorjema smo nadgradili na izviren način, z dodatkom pozitivne povratne zanke sestavljene iz dveh aktivatorjev TAL, ki sprožita lastno transkripcijo ter hkrati transkripcijo nasprotnega represorja TAL. Aktivatorji TAL pozitivne povratne zanke z represorji TAL tekmujejo za skupna vezavna mesta. Tako deterministični kot stohastični računalniški modeli (Modelling – positive ..., 2012), pripravljene tekom projekta iGEM 2012 so pokazali, da lahko pri preklopnem stikalu z dodano pozitivno povratno zanko, bistabilnost dosežemo tudi brez visoke kooperativnosti represorjev. Hkrati so računalniški modeli predpostavili večjo robustnost preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko in manjšo občutljivost na puščanje promotorja v primerjavi s preklopnim stikalom z dvema represorjema. Za razliko od preklopnega stikala z dvema represorjema, kjer smo uporabili konstitutivne promotorje, smo pri preklopnem stikalu s pozitivno povratno zanko v tretjem nivoju stikala uporabili minimalne promotorje z zanemarljivim puščanjem (Slika 26b), s čimer smo povečali robustnost stikala.

5.1.4.1 Tekmovanje med represorjem in aktivatorjem

V okviru magistrske naloge nas je zanimalo, kateri izmed sintetičnih transkripcijskih faktorjev TAL, represor ali aktivator, ki tekmujeta za skupna vezavna mesta, prevlada, če sta prisotna oba hkrati. Testirali smo več različnih razmerij med represorji in aktivatorji TALA (Slika 37b) oziroma TALB (Slika 37c) in v obeh primerih se je izkazalo, da se nivo aktivacije izražanja poročevalskega gena, tudi kadar je aktivator v 10-kratnem prebitku v primerjavi z represorjem, zniža za več kot polovico. Kljub temu je do popolne inhibicije izražanja poročevalskega gena fLuc prišlo šele, ko je bilo represorja TAL približno dvakrat več v primerjavi z aktivatorjem TAL. Pokazali smo jasno nelinearno izražanje poročevalskega gena v odvisnosti od razmerja med represorjem in aktivatorjem, kar

pomeni, da lahko tudi z nekooperativnimi genskimi elementi v sistem vnesemo nelinearnost. Iz rezultatov smo sklepali, da bi bilo preklapljanje med dvema stanjema v sistemu s takšno topologijo mogoče.

5.1.4.2 Inducibilni sistem na osnovi aktivatorjev TAL

Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko smo želeli nadzorovati z zunanjimi signali, zato smo enako kot pri preklopnem stikalu z dvema represorjema uporabili dva že okarakterizirana inducibilna sistema, Pip_{ON} (Fussenegger in sod., 2000) ter E_{ON} (Weber in sod., 2002). Zaradi uporabe minimalnih promotorjev smo v drugem nivoju stikala poleg represorjev TAL (Poglavje 5.1.3.1) dodali še aktivatorja TAL pod nadzorom inducibilnih represorjev Pip:KRAB in E:KRAB. Želeli smo določiti optimalno količino inducibilnega represorja Pip:KRAB oziroma E:KRAB, s katero lahko dosežemo najvišji nivo aktivacije izražanja poročevalskega gena fLuc preko aktivatorjev TAL ob stimulaciji s pristinamicinom oziroma eritromicinom. Za testiranje sistema smo uporabili poročevalski plazmid, ki je vseboval gen za fLuc pod nadzorom minimalnega promotorja (pMIN) pred katerim so se nahajala vezavna mesta za aktivatorje TAL. Ob stimulaciji s pristinamicinom smo dosegli do 3-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena (Slika 38b), medtem ko smo pri stimulaciji z eritromicinom dosegli tudi do več kot 6-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena (Slika 38b).

5.1.4.3 Delovanje preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko

Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko, ki smo ga pripravili, je moč nadzorovati z dvema induktorjema, pristinamicinom in eritromicinom. V odvisnosti od induktorja naj bi stikalo zavzelo eno izmed dveh možnih stanj, ki ju zastopata poročevalska fluorescentna proteina BFP (stanje 1) in mCitrine (stanje 2). Z izboljšavami v primerjavi s preklopnim stikalom z dvema represorjema, smo s preklopnim stikalom z dodano pozitivno povratno zanko, ob konstantno dodanem induktorju, dosegli izražanje inducirane poročevalskega fluorescentnega proteina, medtem ko se fluorescentni protein drugega stanja ni izražal (Slika 39). S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da stikalo tudi po odstranitvi induktorja ohrani stabilno stanje do deset dni po preklopu (Slika 40). Za potrditev delovanja izboljšane preklopnega stikala smo preverili, ali je z menjavo induktorja možen prekop iz enega stabilnega stanja v drugo (Slika 41). Stimuliranim celicam smo po treh dneh zamenjali gojišče in dodali drug induktor (namesto pristinamicina eritromicin ali obratno). Iz slike 41a je razvidno, da se že nekaj dni po preklopu iz prvega v drugo stanje, poleg prvega poročevalskega proteina BFP prične izražati tudi drugi poročevalski protein mCitrine, medtem ko je emisija poročevalskega proteina BFP deseti dan po preklopu še vidna, najverjetneje zaradi dolge razpolovne dobe fluorescentnih proteinov. Za poročevalski protein BFP le-ta znaša kar 54 ur (Subach in sod., 2011). Razpolovno dobo fluorescentnih proteinov bi lahko zmanjšali z dodatkom zapisa za peptid, ki označi protein za razgradnjo, s čimer bi skrajšali čas potreben za prekop stikala iz enega v drugo stanje. Spremljali smo tudi prekop iz stanja 2 v stanje 1 (Slika 41b), le da smo v tem primeru celice najprej inducirali z eritromicinom, ga po treh dneh odstranili ter dodali pristinamicin. Deset dni po preklopu se je izražanje poročevalskega proteina mCitrine občutno zmanjšalo, medtem ko je jasno vidno izražanje poročevalskega proteina BFP.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili, da stikalo ob konstantno dodanem induktorju zavzame stabilno stanje in to stanje ohrani tudi po odstranitvi induktorja. Hkrati smo pokazali, da je z menjavo induktorja možno preklopiti iz enega stanja stikala v drugo.

5.1.5 Uporaba genskih stikal

Genska preklopna stikala so potencialno uporabna za nadzorovano zdravljenje različnih bolezni, kot je na primer hepatitis C, kjer se pacienti zaradi sistemske aplikacije zdravil soočajo s hudimi stranskimi učinki. Namesto sistemske aplikacije zdravil bi v pacienta lokalno na mesto okužbe vstavili mikroenkapsulirane sesalske celice s preklopnim stikalom. V primeru hepatitisa C bi v celicah z zunanjimi signali lahko na primer inducirali produkcijo interferona alfa z antivirusnim učinkom, po odstranitvi virusne okužbe pa preklopili v produkcijo hepatocitnega rastnega faktorja za regeneracijo tkiva (Implementation overview, 2012). Celice bi tako *in situ* proizvajale želeno biološko zdravilo. Prednost preklopnih stikal je tudi zmožnost ohranitve stabilnega stanja že po kratkem stimulusu induktorja (npr. antibiotika, svetlobe). To je pomembno, saj je prekomerna uporaba antibiotikov za paciente toksična, hkrati pa lahko vodi do pojava rezistence.

Preklopna stikala bi se lahko s pridom izkoristila za pripravo biosenzorjev, velik potencial pa genska stikala predstavljajo tudi na področju biološkega računalništva. Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko je nadgradnja preklopnega stikala z dvema represorjema, ki v elektronskih vezjih predstavlja dve logični funkciji NOR, povezani med seboj. S povezovanjem takšnih enostavnih logičnih vrat, ki temeljijo na ortogonalnih elementih, lahko v celicah pripravimo kompleksna gensko-regulatorna omrežja. Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko, ki smo ga pripravili v magistrski nalogi, ohrani stabilno stanje tudi po odstranitvi induktorja, kar lahko primerjamo z osnovnimi spominskimi elementi v elektroniki. V eni sami celici bi s pripravo več takšnih ortogonalnih preklopnih stikal lahko zgradili biološki spomin, kar je eden izmed večjih izzivov sintezne biologije. S pripravo treh ortogonalnih bistabilnih stikal v celici bi lahko dosegli osem različnih stanj, medtem ko bi tisoč različnih stanj lahko dosegli že samo z desetimi preklopnimi stikali. V magistrski nalogi smo pokazali, da so efektorji TAL, kljub nekooperativnosti, odlično orodje za pripravo genskih stikal. Preklopno stikalo s pozitivno povratno zanko, ki smo ga pripravili, potrjuje potencial uporabe efektorjev TAL v kompleksnejših gensko-regulatornih omrežjih, kot so na primer oscilatorji.

6 SKLEPI

- DNA vezavne domene efektorjev TAL spojene z represorsko domeno KRAB so učinkoviti sintetični transkripcijski represorji, s katerimi smo dosegli več kot 90 odstotno inhibicijo izražanja poročevalskega gena.
- DNA vezavne domene efektorjev TAL spojene z aktivatorsko domeno VP16 so učinkoviti sintetični transkripcijski aktivatorji, s katerimi smo dosegli tudi do 3000-kratno aktivacijo izražanja poročevalskega gena.
- Eksperimentalno smo pokazali, da izvedba preklopnega stikala na osnovi dveh ortogonalnih represorjev TAL z medsebojno inhibicijo ni mogoča, ker regulatorji TAL delujejo kot monomeri.
- Prvič smo predstavili koncept in eksperimentalno potrditev izvedbe preklopnega stikala na osnovi modularnih DNA vezavnih elementov.
- Preklopno stikalo z dvema represorjema smo nagradili tako, da smo v sistem vnesli pozitivno povratno zanko ter kompeticijo za vezavna mesta pred promotorjem.
- Preklopno stikalo z dodano pozitivno povratno zanko temelji na osnovi ortogonalnih represorjev TAL ter aktivatorjev TAL, ki tekmujejo za skupna vezavna mesta. Dokazali smo, da izboljšano stikalo ob konstantno dodanem induktorju doseže obe stabilni stanji. Stabilnost obeh stanj se ohrani tudi po odstranitvi induktorja, s čimer smo potrdili stabilnost stikala. Hkrati smo dokazali, da z menjavo induktorja lahko prelopimo iz enega v drugo stanje.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Eden izmed ključnih tehnoloških izzivov sintezne biologije je priprava velikega števila ortogonalnih regulatornih elementov s katerimi bi lahko pripravili kompleksna gensko-regulatorna omrežja. Večina do danes pripravljenih genskih preklonnih stikal temelji na prokariotskih transkripcijskih faktorjih (Gardner in sod., 2000; Kramer in sod., 2004b), medtem ko smo v magistrski nalogi pripravili preklonno stikalo z ortogonalnimi transkripcijskimi faktorji na osnovi efektorjev TAL, ki imajo v primerjavi z naravnimi bakterijskimi transkripcijskimi faktorji številne prednosti. DNA vezavne domene TAL smo v magistrskem delu spojili z represorsko domeno KRAB ali aktivatorsko domeno VP16 in tako pripravili ortogonalne sintetične transkripcijske faktorje. Eksperimentalno smo dokazali, da tako represorji TAL kot aktivatorji TAL učinkovito in specifično uravnavajo izražanje tarčnih genov. Za preklonno stikalo je značilno, da lahko zavzame eno izmed dveh stabilnih stanj, odvisno od vhodnega signala. Zaradi nizke kooperativnosti DNA vezavnih domen TAL, preklonno stikalo na osnovi dveh represorjev ni izkazalo bistabilnosti. Računalniški modeli so predpostavili, da je bistabilnost stikala moč doseči tudi brez kooperativnosti, v primeru vnosa nelinearnosti v sistem. To smo dosegli z nadgradnjo preklonnega stikala tako, da smo v sistem dodali pozitivno povratno zanko na osnovi aktivatorjev TAL. Eksperimentalno smo pokazali, da preklonno stikalo s pozitivno povratno zanko ob konstantno dodanem induktorju lahko zavzame inducirano stanje in ga po odstranitvi induktorja tudi ohrani. Hkrati smo lahko z menjavo induktorja pokazali preklapljanje iz enega stanja stikala v drugo.

7.2 SUMMARY

One of the main technological challenges in synthetic biology is preparation of a large number of orthogonal regulatory elements which can be used to create complex gene-regulatory networks. Most genetic switches prepared to this day are based on prokaryotic transcription factors (Gardner et al., 2000; Kramer et al., 2004b), while in this thesis, we prepared a toggle switch with orthogonal transcription factors, based on TAL effector proteins. The latter exhibit many advantages compared to bacterial transcription factors. We fused TAL DNA binding domains with KRAB repression domain or VP16 activation domain and thus prepared orthogonal synthetic transcription factors. We experimentally demonstrated that both, TAL repressors and TAL activators, efficiently and specifically regulate target gene expression. The main characteristics of a toggle switch is its ability to assume one of the two stable states, depending on the input signal. Due to low cooperativity of TAL DNA binding domains, the toggle switch based on two repressors did not exhibit bistability. Previous modeling studies indicate that bistability could be achieved by noncooperative gene regulatory elements by introducing nonlinearity into the system. This was achieved with an upgrade of the toggle switch by addition of a positive feedback loop based on two TAL activators. We have experimentally shown that the improved switch may assume the induced state when an inducer is constantly present and remains

stable even after the removal of the inducer. At the same time we have shown switching between stable states by reversing the inducer molecule.

8 VIRI

- Akopian A., He J., Boocock M.R., Stark W.M., 2003. Chimeric recombinases with designed DNA sequence recognition. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100: 8688-8691
- Alanis A.J. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the postantibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36: 697-705
- Anderson J. C., Voigt C. A., Arkin A. P. 2007. Environmental signal integration by a modular AND gate. *Molecular Systems Biology*, 3, 133: 1-8
- Andrianantoandro E., Basu S., Karig D. K., Weiss R. 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular Systems Biology*, 2: 1-14
- Ausländer S., Ausländer D., Müller M., Wieland M., Fussenegger M. 2012. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature*, 487: 123-127
- Ausländer S., Fussenegger M. 2013. From gene switches to mammalian designer cells: present and future prospects. *Trends in Biotechnology*, 31, 3: 155-168
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 2002. *Short protocols in molecular biology*. 5th ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.
- Beerli R.R., Dreier B., Barbas III, C.F., 2000. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 1495-1500
- Bellefroid E.J., Poncelet D.A., Lecocq P.J., Revelant O., Martial J.A. 1991. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 88: 3608-3612
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326, 5959: 1509-1512
- Boch J., Bonas U. 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 419-436
- Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B. 1989. Genetic and Structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Genetics and Genomics*, 218: 127-136

- Braselman S., Graninger P., Busslinger M. 1993. A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 90, 5: 1657-1661
- Brent R., Ptashne M. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 43: 729-736
- Casadesus J., D'Ari R. 2002. Memory in bacteria and phage. *Bioessays*, 24, 6: 512-518
- Cherry J.L., Adler F.R. 2000. How to make a biological switch. *Journal of Theoretical Biology*, 203: 117-133
- Choo Y., Klug A. 1993. A role in DNA binding for the linker sequences of the first three zinc fingers of TFIIIA. *Nucleic Acids Research*, 21, 15: 3341-3346
- Choo Y., Klug A. 1994. Toward a code for interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on a phage. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91, 23: 11163-11167
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186: 757-761
- Cong L., Zhou R., Kuo Y.C., Cunniff M., Zhang F. 2012. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nature Communications*, 3, 968: 1-6
- DeFrancesco, L. 2011. Move over ZFNs. *Nature Biotechnology*, 29: 681-684
- Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.K., Shi Y., Yan N. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335: 720-723
- Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System. 2011. Madison, Promega: 25 str. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Dual%20Luciferase%20Reporter%20Assay%20System%20Protocol.pdf> (marec 2013)
- Elowitz M.B., Leibler S. 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403: 335-338
- Frankel A.D., Berg J.M., Pabo C.O. 1987. Metal-dependent folding of single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 84: 4841-4845
- Friedland A. E., Lu T.K., Wang X., Shi D., Church G., Collins J.J. 2009. Synthetic gene networks that count. *Science*, 324: 1199-1202

- Fussenegger M., Morris R.P., Fux C., Rimann M., Stockar B., Thompson C.J., Bailey J.E. 2000. Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18: 1203-1208
- Gardner T-S., Cantor C.R., Collins J.J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403: 339-342
- Garg A., Lohmueller J. J., Silver P. A., Armel T.Z. 2012. Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites. *Nucleic Acids Research*, 40: 7584-7595
- Gebelein B., Urrutia R. 2001. Sequence-specific transcriptional repression by KS1, a multiple-zinc-finger-Kruppel-associated box protein. *Molecular and Cellular Biology*, 21: 928-939
- Gibson D.G., Russello S. 2013. Gibson assembly® - building a synthetic biology toolset. Ipswich, New England Biolabs: 4 str.
<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/gibson-assembly-building-a-synthetic-biology-toolset> (avgust 2013)
- Gitzinger M., Kemmer C., Daoud-El Baba M., Weber W., Fussenegger M. 2009. Controlling transgene expression in subcutaneous implants using a skin lotion containing the apple metabolite phloretin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 106: 10638-10643
- Gitzinger M., Kemmer C., Fluri D.A., Daoud-El Baba M., Weber W., Fussenegger M. 2012. The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research*, 40, 5: 1-15
- Goldman N., Bertone P., Chen S., Dessimoz C., Leproust E.M., Sipos B., Birney E. 2013. Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA. *Nature*, 494: 77-80
- Greber D., Fussenegger M. 2007. Mammalian synthetic biology: engineering of sophisticated gene networks. *Journal of Biotechnology*, 130: 329-345
- Greber D., Daoud El-Baba M., Fussenegger M. 2008. Intronicly encoded siRNAs improve dynamic range of mammalian gene regulation systems and toggle switch. *Nucleic Acids Research*, 36, 16: 1-16
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carrol S.B. 2008. Introduction to genetic analysis. 9th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 838 str.
- Gossen M., Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 5547-5551

- Gu K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G.L., White F.F., Yin Z. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435: 1122-1125
- Hall D.B., Struhl K. 2002. The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 48: 46043-46050
- Herbers K., Conrads-Strauch J., Bonas U. 1992. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature*, 356: 172-174
- Hartenbach S., Daoud-El Baba M., Weber W, Fussenegger M. 2007. An engineered L-arginine sensor of *Chlamydia pneumoniae* enables arginine-adjustable transcription control in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research*, 35, 20: 1-13
- Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C.S., Gao Q., Cassady J.P., Cost G.J., Zhang L., Santiago Y., Miller J.C., Zeitler B., Cherone J.M., Meng X., Hinkley S.J., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Jaenisch R. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*, 29: 731-734
- Hopkins C.M., White F.F., Choi S.H., Guo A., Leach J.E. 1992. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 6: 451-459
- Huang P., Xiao A., Zhou M., Zhu Z., Lin S., Zhang B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature Biotechnology*, 29: 699-700
- Implementation overview. 2012. Ljubljana, iGEM Team Slovenia: 3 str. <http://2012.igem.org/Team:Slovenia/Implementation> (junij 2013)
- jetPEITM *in vitro* DNA Transfection Protocol. 2012. Illkirch Cedex, Polyplus-transfection SA: 16 str. http://www.polyplus-transfection.com/wp-content/uploads/2009/08/CPT_101_jetPEI_vN.pdf (marec 2013)
- Kapunisk-Uner J.E., Sande M.A., Chambers H.F.S. 1996. Drug toxicity and poisoning. V: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Limbierd L.E. (ed.). McGraw-Hill, New York: 1123-1135
- Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318, 5850: 648-651
- Khalil A.S., Collins J.J. 2010. Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, 11, 5: 367-379

- Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 1156-1160
- Klug A. 2010. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 213-231
- Knight T. F. 2003. Idempotent vector design for standard assembly of BioBricks. Technical Report. Boston, MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports: 11 str.
<http://web.mit.edu/synbio/release/docs/biobricks.pdf> (avgust 2013)
- Kohler C., Grossniklaus U. 2002. Epigenetic inheritance of expression states in plant development: the role of Polycomb group proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14, 6: 773-779
- Kramer B.P., Fischer C., Fussenegger M. 2004a. BioLogic gates enable logical transcription control in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 4: 478-484
- Kramer B.P., Viretta A.U., Daoud-El-Baba M., Aubel D., Weber W., Fussenegger M., 2004b. An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 7: 867-870
- Laity J.H., Lee B. M., Wright P. E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 39-46
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 4860: 1759-1764
- Lee M.S., Gippert G.P., Soman K.V., Case D.A., Wright P.E. 1989. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA binding domain. *Nature*, 245, 4918: 635-637
- Li T., Huang S., Jiang W.Z., Wright D., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. 2010. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*, 39, 1: 359-372
- Liu O., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas III C.F. 1997. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 5525-5530
- Macía J., Widder S., Solé R. 2009. Why are cellular switches Boolean? General conditions for multistable genetic circuits. *Journal of Theoretical Biology*, 261: 126-135

- Mak A.N., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L. 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, 335: 716-719
- Malphettes L., Weber C.C., El-Baba M.D., Schoenmakers R.G., Aubel D., Weber W., Fussenegger M., 2005. A novel mammalian expression system derived from components coordinating nicotine degradation in *arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Nucleic Acids Research*, 33, 12: 1-13
- Mayo A. E., Setty Y., Shavit S., Zaslaver A., Alon U. 2006. Plasticity of the cis-regulatory input function of a gene. *PLoS Biology*, 4, 4: 555-561
doi:10.1371/journal.pbio.0040045
- Mercer, A.C., Gaj T., Fuller R.P., Barbas III C.F. 2012. Chimeric TALE recombinases with programmable DNA sequence specificity. *Nucleic Acids Research*, 40, 21: 11163-11172
- Miller J., McLachlan A.D., Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* Oocytes. *The EMBO Journal*, 4, 6: 1609-1614
- Miller J. C., Tan S., Qiao G., Barlow K. A., Wang J., Xia D. F., Meng X., Paschon D. E., Leung E., Hinkley S. J., Dulay G. P., Hua K. L., Ankoudinova I., Cost G. J., Urnov F. D., Zhang H. S., Holmes M. C., Zhang L., Gregory P. D., Rebar E. J. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29: 143-148
- Modelling – mutual repressor switch. 2012. Ljubljana, iGEM Team Slovenia: 12 str.
<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/ModelingMutualRepressorSwitch> (junij 2013)
- Modelling – positive feedback loop switch. 2012. Ljubljana, iGEM Team Slovenia: 13 str.
<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/ModelingPositiveFeedbackLoopSwitch> (junij 2013)
- Monod J., Jacob F. 1961. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26: 389-401
- Moscou M.J., Bogdanove A.J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326, 5959: 1501
- Orlando V. 2003. Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell*, 112, 5: 599-606
- Pabo C. O., Sauer R. T. 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 1053-1095

- Panke S. 2008. Synthetic biology – engineering in biotechnology. Zürich, Swiss Academy of Engineering Sciences: 64 str.
- Pavletich N.P., Pabo C.O. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252, 5007: 809-817
- pcDNA3 – molecular info. 2013. Carlsbad, Invitrogen™ life technologies: 1 str.
<http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pcdna3.pdf> (avgust, 2013)
- Peng H., Begg G.E., Harper S.L., Friedman J.R., Speicher D.W., Rauscher F.J. 2000. Biochemical analysis of the kruppel-associated Box (KRAB) transcriptional repression domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 24: 18000-18010
- pGL4.16[luc2CP/Hygro vector product information. 2013. Madison, Promega: 2 str.
<https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/A/pGL416%20Vector.pdf> (avgust, 2013)
- Positive feedback loop switch. 2012. Ljubljana, iGEM Team Slovenia: 9 str.
<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/TheSwitchPositiveFeedbackLoopSwitch> (maj 2013)
- Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F., Joung K. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods* 5, 5: 374-375
- Rivera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cerasoli Jr. F., Holt D.A., Gilman M. 1996. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nature Medicine*, 2, 9: 1028-1032
- Römer P., Hahn S., Jordan T., Strauß T., Bonas U., Lahaye T. 2007. Plant-pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*, 318, 5850: 645-48
- Sanchez A.R., Rogers R.S.III, Sheridan P.J. 2004. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology*, 43: 709-715
- Sander J.D., Cade L., Khayter C., Reyon D., Peterson R.T., Joung J.K., Yeh J.R.J. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, 29, 8: 697-698
- Siuti P., Yazbek J., Lu T.K. 2013. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology*, 31: 448-452

- Subach O.M., Cranfill P.J., Davidson M.W., Verkhusha V.V. 2011. An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore. *PLoS ONE*, 6, 12: 1-9
doi:10.1371/journal.pone.0028674
- Sung Y.H., Baek I.J., Kim D.H., Jeon J., Lee J. Lee K., Jeong D., Kim J.S., Lee H.W. 2013. Knockout mice created by TALEN mediated gene targeting. *Nature Biotechnology*, 31: 23-24
- Synthetic renilla luciferase reporter vectors. 2002. Madison, Promega Cooperation: 49 str.
<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/promega/tm237.pdf> (avgust, 2013)
- TAL-based transcriptional regulators. 2012. Ljubljana, iGEM Team Slovenia: 6 str.
<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/TheSwitchDesignedTALregulators>
(marec 2013)
- Tan W., Zhu K., Segal D.J., Barbas III C.F., Chow S.A., 2004. Fusion proteins consisting of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C direct integration of viral DNA into specific sites. *Journal of Virology*, 78: 1301-1313
- Tigges M., Marquez-Lago T.T., Stelling J., Fussenegger M. 2009. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature*, 457: 309-312
- Urrutia R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biology*, 4, 10: 231
doi:10.1186/gb-2003-4-10-231
- Van den Ackerveken G., Marois E., Bonas U. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, 87: 1307-1316
- Vissing H., Meyer W.K., Aagaard L., Tommerup N., Thiesen H.J. 1995. Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Letters*, 369: 153-157
- Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 4356: 737-738
- Weber W., Fux C., Daoud-El Baba M., Keller B., Weber C.C., Kramer B.P., Heinzen C., Aubel D., Bailey J.E., Fussenegger M. 2002. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nature Biotechnology*, 20: 901-907
- Weber W., Schoenmakers R., Spielmann M., El-Baba M.D., Folcher M., Keller B., Weber C.C., Link N., van de Wetering P., Heinzen C., Jolivet B., Séquin U., Thompson C.J., Fussenegger M. 2003. Streptomyces-derived quorum-sensing systems engineered for adjustable transgene expression in mammalian cells and mice. *Nucleic Acids Research*, 31, 14: 1-9

- Weber W., Bacchus W., Gruber F., Hamberger M., Fussenegger M. 2007. A novel vector platform for vitamin H-inducible transgene expression in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, 131: 150-158
- Wegener H.C., Bager F., Aarestrup F.M. 1997. Surveillance of antimicrobial resistance in humans, food stuffs and livestock in Denmark. *Eurosurveillance*, 2, 3: 17-19
- Widder S., Macía J., Solé R. 2009. Monomeric Bistability and the Role of Autoloops in Gene Regulation. *PLoS ONE*, 4, 4: 1-7
doi:10.1371/journal.pone.0005399
- Wood A.J., Lo T.W., Zeitler B., Pickle C.S., Ralston E.J., Lee A.H., Amora R., Miller J.C., Leung E., Meng X., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Meyer B.J. 2011. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 333: 307-307
- Wysocka J., Herr W. 2003. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 6: 294-304
- Xu G.L., Bestor T.H. 1997. Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nature Genetics*, 17: 376-378
- Xu H., Morrical S.W. 2010. Protein motifs for DNA binding. V: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, John Wiley & Sons: 1-8
- Yang B., Sugio A., White F.F. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103, 27: 10503-10508
- Yang Y., Gabriel D.W. 1995. *Xantomonas* avirulence/photogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 4: 627-631
- Zhang F., Cong L., Lodato S., Kosuri S., Church G. M., Arlotta P. 2011 Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature Biotechnology*, 29: 149-153
- Zhao H.F., Boyd J., Jolicoeur N., Shen S.H. 2003. A coumermycin/novobiocin-regulated gene expression system. *Human Gene Therapy*, 14, 17: 1619-1629
- Zhu W., Yang B., Chittoor J.M., Johnson L.B., White F.F. 1998. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 824-832

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof.dr Romanu Jerali, ki mi je omogočil sodelovanje pri projektu iGEM 2012 ter opravljanje magistrske naloge v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Hvala za številne nasvete tekom dela ter za hiter in natančen pregled magistrske naloge.

Zahvaljujem se prof.dr. Gregorju Anderluhu za prevzem mentorstva.

Zahvaljujem se prof.dr. Simonu Horvatu za hiter in strokoven pregled magistrske naloge.

Za pomoč pri laboratorijskem delu ter za vso potrpežljivost se zahvaljujem Alji, Janu, Vidi, Roku, Anžetu, ki so kot mentorji sodelovali pri projektu iGEM 2012. Hvala za vso dobro voljo ter vse izkušnje, ki ste jih delili z nami. Še posebej hvala tudi Tini za nasvete pri pisanju magistrske naloge.

Zahvala je namenjena tudi celotni ekipi iGEM 2012 za razumevanje, dobro družbo ter ustvarjanje prijetnega in vzpodbudnega delovnega okolja ter za vse nepozabne trenutke, ki smo jih preživeli skupaj, kot v laboratoriju kot izzven.

Hvala dr. Mojci Benčina za pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim v Laboratoriju za biotehnologijo za prijetno delovno vzdušje ter za vse nasvete in pomoč.

Na koncu gre zahvala še vsem domačim, ki so me ves čas spodbujali in podpirali – hvala, brez vas mi ne bi uspelo!

PRILOGE

Priloga A: DNA konstrukti uporabljeni v magistrski nalogi.

Represorji TAL:

- pCMV-linker 1-TALA-NLS-KRAB
- pCMV-linker 1-TALB-NLS-KRAB
- pCMV-linker 1-NLS-KRAB-TALA
- pCMV-linker 1-NLS-KRAB-TALB
- pCMV-linker 1-NLS-KRAB-TALA-NLS-KRAB
- pCMV-linker 1-NLS-KRAB-TALB-NLS-KRAB

Aktivatorji TAL:

- pCMV-linker 1-TALA-NLS-VP16
- pCMV-linker 1-TALB-NLS-VP16

Poročevalski plazmidi:

- [10XA]-linker 2-pCMV-linker 3-fLuc
- [10XB]- linker 2-pCMV- linker 3-fLuc
- [10XA]- linker 6-pMIN- linker 7-fLuc
- [10XB]- linker 6-pMIN- linker 7-fLuc
- [10XA]-linker 2-pCMV-linker 5-TALB-NLS-KRAB-t2A-BFP
- [10XB]-linker 2-pCMV-linker 5-TALA-NLS-KRAB-t2A-mCitrine
- [10XA]-linker 6-pMIN-linker 7-TALB-NLS-KRAB-t2A-BFP
- [10XB]-linker 6-pMIN-linker 7-TALA-NLS-KRAB-t2A-mCitrine

Inducibilni sistemi:

- pCMV-linker 4-Pip:KRAB
- pCMV- linker 4-E:KRAB
- PIR-pCMV-linker 1-TALB-NLS-KRAB
- PIR-pCMV- linker 1-TALA-NLS-VP16
- ETR-pCMV-linker 1-TALA-NLS-KRAB
- ETR-pCMV-linker 1-TALB-NLS-VP16

Pozitivna povratna zanka:

- [10XA]-linker 6-pMIN-linker 7-TALA-NLS-VP16
- [10XB]-linker 6-pMIN-linker7-TALB-NLS-VP16

Priloga B: Nukleotidna zaporedja posameznih segmentov, ki jih vsebujejo DNA konstrukti uporabljeni v magistrski nalogi.

TALA

gactcaaaagaccatgacgggtattataaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaagatggccccaagaagaaggaaagggtggcgattaccgcggggctacattggtgga
ctttagggacactcggttattcgcaacagcaacaggagaataaagcctaaggctcaggagcaccgtcgcgcaacaccacgagggcctgtggggcatggcttccactatgctcatattgtcgc
gctttcacagcaccctgcggcgcttgggacgggtgctgtcaataaccaagatatgattggccctgcccgaaagccacgcacgaggaattgtaggggtcggttaaacagfgtgtcgggagcgc
gagcacttgaggcgctgctgactgtggcggtgagcttagggggcctccgctccagctcgacacgggcagctgctgaagatcgcgaagagagggggagtaacagcggtagagggcagtg
cacgcttggcgcaatgctgcaccggggccccccttgaacctgacccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcaaacggagggggaaagcaagccctggaaaccgtgcgaagggttggccg
gtcctttgcaagaccacggccttacaccggagcaagctgtgcccattgcaagcaatgggggtgcaaacaggctcttgagacgggttcagagacttctccagttctctgcaagcccacgggc
tgactcccgatcaagttgtagcgattgtcgtcaacattggagggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgggtgcaagcccacggtttgacgcctgcacaagtggtcgc
atcgccagccatgatggcggttaagcagggcgtggaacaagtacagcgctgtgctgtactgtgccaggatcatggactgacccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcaaacggaggggg
gaaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgtgcccgttcttgcgaagaccacggccttacaccggagcaagtcgtggccattgcaataataacgggtggcaaacaggctctgagacgg
ttcagagacttctccagtttctctgcaagcccacgggctgactccgatcaagttgtagcgattgtcgtcatgacggaggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgt
gtcaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctgctgaatggcgccggtgaagcagggcgtggaacagtacagcgctgctgctgactgtgccagatcatggactgacc
ccagaccaggtagtgcgaatcgcgaacaataatgggggaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgtgcccgttcttgcgaagaccacggccttacaccggagcaagtcgtggccat
tgatcccacgacgggtggcaaacaggctcttgagacgggttcagagacttccagttcttgcgaagcccacgggctgactccgatcaagttgtagcgattgtcgtccaacgggtggagggaaa
cagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgcgaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctgccagccatgatggcggttaagcagggcgtggaacaagtacag
cgctgctgctgtactgtgccagatcatggactgaccccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcacatgacgggggaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgtggtgcccgtcttgt
caagaccacggccttacaccggagcaagctgtgcccattgcatcccacgacggtggcgaacaggcctcttgagacgggttcagagacttccagtttctgtcaagcccacgggctgactccc
gatcaagttgtagcgattgtcgaatacaatggaggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgcgaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctgccat
gccaatggcggttaagcagggcgtggaacagtacagcgctgtgctgtactgtgccagatcatggactgacaccggaacagggtgtgcccattgtcttaagggggagagcgccca
gccttggagtcacatgtagcccaattgtccagcccgatccgcgttggctgcgttaacgaatgaccatctgtggcggttgcatgtcttggtagaccgccgcgtcatgcatcaaaaagg
gtctgctcatgctcccgcattgatcaaaaagaaccaaccggcgattcccagagaacttccatcgatgcgggattcc

TALB

gactcaaaagaccatgacgggtattataaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaagatggccccaagaagaaggaaagggtggcgattaccgcggggctacattggtgga
cttgagacactcggttattcgcaacagcaacaggagaataaagcctaaggctcaggagcaccgtcgcgcaacaccacgagggcgttggggcatggcttccactatgctcatattgtcgc
gctttcacagcaccctgcggcgcttgggacgggtgctgtcaataaccaagatatgattggccctgcccgaaagccacgcacgaggaattgtaggggtcggttaaacagfgtgtcgggagcgc
gagcacttgaggcgctgctgactgtggcggtgagcttagggggcctccgctccagctcgacacgggcagctgctgaagatcgcgaagagagggggagtaacagcggtagagggcagtg
cacgcttggcgcaatgctgcaccggggccccccttgaacctgacccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcacatgacgggggaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggttggccg
gtcctttgcaagaccacggccttacaccggagcaagctgtgcccattgcaagcaatgggggtgcaaacaggccttgagacgggttcagagacttccagtttctgtcaagcccacgggc
tgactcccgatcaagttgtagcgattgtcgtcaacgttgagggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgggtgcaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtcgc
atcgccagccatgatggcggttaagcagggcgtggaacagtacagcgctgtgctgtactgtgccaggatcatggactgacccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcacatgacgggg
gaaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgtgcccgttcttgcgaagaccacggccttacaccggagcaagtcgtggccattgcaataataacgggtggcaaacggccttgagacgg
ttcagagacttctccagtttctgtcaagcccacgggctgactccgatcaagttgtagcgattgtcgtccaacgggtggaggggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgt
gtcaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctgcaatggcgccggaatggcgccggtgaagcagggcgtggaacagtacagcgctgctgctactgtgccagatcatggactgacc
ccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcaaacggaggggggaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgtgcccgttcttgcgaagaccacggccttacaccggagcaagtcgtggcca
ttgatcccacgacgggtggcaaacaggccttgcagcggttcagagacttccagtttcttgcgaagcccacgggctgactccgatcaagttgtagcgattgtcgtcatgaggggaa
acaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgcgaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctccaattgtggcggttaagcagggcgtggaacaagtacag
cgcttgcctgctactgtgccagatcatggactgaccccagaccaggtagtgcgaatcgcgtcacatgacgggggaagcaagccctggaaaccgtgcaaaagggtgttggccgtcttgt
caagaccacggccttacaccggagcaagctgtgcccattgcaagcaatcgtggcggaacaggcctcttgagacgggttcagagacttccagtttctgtcaagcccacgggctgactccc
gatcaagttgtagcgattgtcgtccaacgggtggaggggaacaagcattggagactgtccaacggctccttccgtgttgcgaagcccacgggttgacgcctgcacaagtggtgcgcctgccatgcca
gccaatggcggttaagcagggcgtggaacagtacagcgctgtgctgtactgtgccagatcatggactgacaccggaacagggtgtgcccattgtcttaagggggagagcgccca
gccttggagtcacatgtagcccaattgtccagcccgatccgcgttggctgcgttaacgaatgaccatctgtggcggttgcatgtcttggtagaccgccgcgtcatgcatcaaaaagg
gtctgctcatgctcccgcattgatcaaaaagaaccaaccggcgattcccagagaacttccatcgatgcgggattcc

linker 1

ttatcgaaattaatacgaactcactatagggagacccaagcttggtagcgagctggatccactagtaacggccgccagtggtgctggaattccgaccatgcaccaccaccaccacc

linker 2

tggctggtgccaccggtaagcagaggatcctgtacgggcccagatatacgcgttg

linker 3

aagcttggcaatccggtactgttggtaaaagccac

linker 4

ttatcgaaattaatacgaactcactatagggagacccaagcttggtagcgagctggatccactagtaacggccgccagtggtgctggaattccacc

linker 5

aagcttggtagcgagctggatccactagtaacggccgccagtggtgctggaattccgaccatgcaccaccaccaccacc

linker 6

tggctggtgccaccggtaagcagaggatct

linker 7

ctcgagggcaatccggtactgttgtaaaagccaccgaattcgccaccatgcaccaccaccaccacc

[10XA]

tttactgctgtcccgttaaaagcagaactcatgctggcagccggggtaccgcaggaagtcgcttactgctgtcccgttaaaagcagaactcaatggaatcacggcgccgccc
gtatctcatcttactgctgtcccgttaaaagcagaactcaatgctggcgctgctgcccgtgctgcaagttgcatcttactgctgtcccgtttaaagagcagaactcaatggatcacggcgccgccc
gtacttgagcgtccttgttactgctgtcccgtttaaagcagaactcatgctggtggccgaccggtaagcagaactagagggtgaccacggttgattgcacagcttactgctgtcccg
cttaaagcagaactcatgctggcagccggggtaccgagggcaagtcgcttactgctgtcccgtttaaagagcagaactcaatggaatcacggcgccgcccgtatctcatcttact
gtgctcccgtttaaagcagaactcaatgctgctgctgcccgtgcccgtgcccagttgcatcttactgctgtcccgtttaaagcagaactcaatggatcacggcgccgcccgtatctcatcttact
ttgttactgctgtcccgtttaaagcagaactca

[10XB]

taaaagcagaactcatcttccgtttccacatcttctggcagccggggtaccgcaggaagtcgctaaagcagaactcatcttccgtttccacatctatggaatcacggcgccgccc
atctcatcttaaagcagcagaactcatcttccgtttccacatctaatgctgctggcgctggccgctgcccagttgcataaaagcagaactcatcttccgtttccacatcttggctgtctcaggga
cctggagcgtccttgaagagcagaactcatcttccgtttccacatcttggctgtgctggccgaccggtaagcagaactagagggtgaccacggttgattgcacagcttactgctgtccc
cttccgtttccacatcttctggcagccggggtaccgcaggaagtcgctaaagcagaactcatcttccgtttccacatctatggaatcacggcgccgcccgtatctcatcttactaaagcaga
gaactcatcttccgtttccacatctaatgctgctggcgctggccgctgcccagttgcataaaagcagaactcatcttccgtttccacatcttggctgtcctagggtacctggagcgtccttgaag
gagcagaactcatcttccgtttccacat

Priloga C: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju učinkovitosti represorjev TALA in TALB.

	[10XA]-pCMV-fLuc (25ng)									
	KRAB:TALA				TALA:KRAB			KRAB:TALA:KRAB		
Količine plazmidov	0 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng
Povprečje RLE	1,449	0,123	0,091	0,080	0,074	0,046	0,038	0,057	0,030	0,023
Standardni odklon	0,077	0,029	0,034	0,027	0,020	0,010	0,009	0,013	0,009	0,005

	[10XB]-pCMV-fLuc (25ng)									
	KRAB:TALB				TALB:KRAB			KRAB:TALB:KRAB		
Količine plazmidov	0 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng
Povprečje RLE	0,765	0,155	0,101	0,089	0,044	0,040	0,037	0,048	0,026	0,025
Standardni odklon	0,053	0,029	0,021	0,013	0,002	0,005	0,017	0,004	0,004	0,001

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 85 ng.

Priloga D: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju specifičnosti vezave represorjev TALA in TALB.

	[10XA]-CMV-fLuc (25 ng)			
	TALB:KRAB		KRAB:TALB	KRAB:TALB:KRAB
Količine plazmidov	0 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Povprečje RLE	2,434	2,057	2,120	2,199
Standardni odklon	0,159	0,437	0,144	0,273

	[10XB]-pCMV-fLuc (25 ng)			
	TALA:KRAB		KRAB:TALA	KRAB:TALA:KRAB
Količine plazmidov	0 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Povprečje RLE	2,698	2,603	2,539	1,393
Standardni odklon	0,122	0,029	0,068	0,378

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 160 ng.

Priloga E: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju učinkovitosti in specifičnosti vezave aktivatorjev TALA in TALB.

	[10XA]-pMIN-fLuc (100 ng)							
	TALA:VP16					TALB:VP16		
Količine plazmidov	0 ng	2,5 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng
Povprečje RLE	0,021	8,388	11,282	14,160	11,179	0,008	0,005	0,003
Standardni odklon	0,012	0,386	0,423	0,340	0,685	0,002	0,000	0,001

	[10XB]-pMIN-fLuc (100 ng)							
	TALB:VP16					TALA:VP16		
Količine plazmidov	0 ng	2,5 ng	5 ng	25 ng	50 ng	5 ng	25 ng	50 ng
Povprečje RLE	0,006	10,562	18,003	20,724	20,406	0,003	0,002	0,002
Standardni odklon	0,002	1,688	0,308	2,427	1,459	0,000	0,000	0,001

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 160 ng.

Priloga F: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju inducibilnih sistemov na osnovi represorjev TAL.

Stimulirane celice	[10XA]-pMIN-fLuc (20 ng) PIR-CMV-TALA:VP16 (5 ng)				[10XB]-pMIN-fLuc (20 ng) ETR-CMV-TALB:VP16 (5 ng)			
	Pip:KRAB				E:KRAB			
Količine plazmidov	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng
Povprečje RLE	0,138	0,160	0,170	0,185	0,034	0,035	0,026	0,038
Standardni odklon	0,029	0,005	0,020	0,007	0,001	0,002	0,001	0,001

Nestimulirane celice	[10XA]-pMIN-fLuc (20 ng) PIR-CMV-TALA:VP16 (5 ng)				[10XB]-pMIN-fLuc (20 ng) ETR-CMV-TALB:VP16 (5 ng)			
	Pip:KRAB				E:KRAB			
Količine plazmidov	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng
Povprečje RLE	0,251	0,382	0,503	0,555	0,075	0,126	0,146	0,125
Standardni odklon	0,021	0,021	0,043	0,027	0,001	0,002	0,005	0,001

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 75 ng.

Priloga G: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti izmerjene pri testiranju inducibilnih sistemov na osnovi aktivatorjev TAL.

Stimulirane celice	[10XA]-pMIN-fLuc (20 ng) PIR-CMV-TALA:VP16 (5 ng)				[10XB]-pMIN-fLuc (20 ng) ETR-CMV-TALB:VP16 (5 ng)			
	Pip:KRAB				E:KRAB			
Količine plazmidov	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng
Povprečje RLE	2,544	2,153	3,293	4,001	2,346	2,541	2,628	2,597
Standardni odklon	0,101	0,184	0,251	0,292	0,084	0,069	0,159	0,130

Nestimulirane celice	[10XA]-pMIN-fLuc (20 ng) PIR-CMV-TALA:VP16 (5 ng)				[10XB]-pMIN-fLuc (20 ng) ETR-CMV-TALB:VP16 (5 ng)			
	Pip:KRAB				E:KRAB			
Količine plazmidov	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng	2,5 ng	5 ng	10 ng	20 ng
Povprečje RLE	1,059	0,909	1,164	1,384	0,582	0,427	0,427	0,682
Standardni odklon	0,077	0,115	0,215	0,252	0,012	0,008	0,008	0,116

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 85 ng.

Priloga H: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici pri testiranju preklopnega stikala z dvema represorjema.

		Količine plazmidov (ng)
Kontrolni plazmid	mCherry	20
1. nivo	Pip:KRAB	90
	E:KRAB	90
2. nivo	PIR-pCMV-TALB:KRAB	60
	ETR-pCMV-TALA:KRAB	60
3. nivo	[10XA]-pCMV-TALB:KRAB-BFP	30
	[10XB]-pCMV-TALA:KRAB-mCitrine	30

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 385 ng.

Priloga I: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici ter izmerjene povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti s pripadajočimi standardnimi odkloni pri testiranju tekmovanja med represorji TAL in aktivatorji TAL za vezavna mesta.

a) Količine plazmidov v transfekcijski mešanici.

[10XA]-pMIN-fLuc (75 ng)					
TALA:VP16	TALA:KRAB				
0 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
10 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
25 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
50 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
100 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng

[10XB]-pMIN-fLuc (75 ng)					
TALB:VP16	TALB:KRAB				
0 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
10 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
25 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
50 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
100 ng	0 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng

* V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida phRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 285 ng.

b) Izmerjene povprečne vrednosti luciferazne aktivnosti (RLE).

		TALA:VP16				
		0ng	10ng	25ng	50ng	100ng
TALA:KRAB	0ng	0,003	7,630	8,048	8,726	6,273
	10ng	0,002	0,967	1,860	3,086	2,336
	25ng	0,001	0,211	0,583	0,901	1,030
	50ng	0,001	0,045	0,157	0,182	0,546
	100ng	0,000	0,010	0,036	0,075	0,247

		TALB:VP16				
		0ng	10ng	25ng	50ng	100ng
TALAB:KRAB	0ng	0,002	10,125	11,073	9,186	9,620
	10ng	0,000	0,367	0,738	1,717	2,391
	25ng	0,000	0,066	0,198	0,488	0,818
	50ng	0,001	0,025	0,082	0,189	0,445
	100ng	0,001	0,008	0,033	0,075	0,197

c) Standardni odkloni.

		TALA:VP16				
		0ng	10ng	25ng	50ng	100ng
TALA:KRAB	0ng	0,0048	0,0027	0,0017	0,0005	0,0002
	10ng	0,0027	0,0792	0,1507	0,3892	0,1923
	25ng	0,0017	0,0167	0,0565	0,0904	0,0594
	50ng	0,0005	0,0035	0,0098	0,0063	0,0265
	100ng	0,0002	0,0013	0,0035	0,0077	0,0062

		TALB:VP16				
		0ng	10ng	25ng	50ng	100ng
TALAB:KRAB	0ng	0,0017	0,0416	0,4815	0,1096	0,0584
	10ng	0,0001	0,0357	0,0718	0,0373	0,1930
	25ng	0,0000	0,0122	0,0429	0,1523	0,1593
	50ng	0,0018	0,0035	0,0226	0,0311	0,0757
	100ng	0,0016	0,0016	0,0041	0,0158	0,0393

Priloga J: Količine plazmidov v transfekcijski mešanici pri testiranju preklopnega stikala s pozitivno povratno zanko.

		Količine plazmidov (ng)
Kontrolni plazmid	mCherry	20
1. nivo	Pip:KRAB	120
	E:KRAB	120
2. nivo	PIR-pCMV-TALB:KRAB	40
	PIR-pCMV-TALA:VP16	40
	ETR-pCMV-TALA:KRAB	40
	ETR-pCMV-TALB:VP16	40
3. nivo	[10XA]-pCMV-TALB:KRAB-BFP	30
	[10XA]-pMIN-TALA:VP16	5
	[10XB]-pCMV-TALA:KRAB-mCitrine	30
	[10XB]-pMIN-TALB:VP16	5

- * V vse transfekcijske mešanice smo dodali še 10 ng plazmida pHRL-TK (kontrolni plazmid) ter prazen vektorski plazmid pcDNA3 v takšni količini, da je bila količina skupne DNA v vseh transfekcijskih mešanicah 490 ng.