

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina LEBAR

**SINTEZA RESVERATROLA Z VEZAVO HIMERNIH  
ENCIMOV NA DNK TER PREVERJANJE  
UČINKOVITOSTI VEZAVE Z REPRESIJO  
TRANSKRIPCIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina LEBAR

**SINTEZA RESVERATROLA Z VEZAVO HIMERNIH ENCIMOV NA  
DNK TER PREVERJANJE UČINKOVITOSTI VEZAVE Z  
REPRESIJO TRANSKRIPCIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**RESVERATROL SYNTHESIS BY BINDING CHIMERIC ENZYMES  
TO DNA AND TESTING BINDING EFFICIENCY THROUGH  
TRANSCRIPTION REPRESSION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja prof. dr. Roman Jerala in za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Mentor: prof.dr. Gregor Anderluh

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Romana Marinšek-Logar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gregor Anderluh  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Tom Turk  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Lebar Tina

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.6: 577.2.083(043)=163.6
KG	metabolni inženiring/programska DNA/plazmidi/plazmidni vektorji/cinkovi prsti/encimi/biosinteza/resveratrol/biosinteza resveratrola
AV	LEBAR, Tina
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/ JERALA, Roman (somentor)/ TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	SINTEZA RESVERATROLA Z VEZAVO HIMERNIH ENCIMOV NA DNK TER PREVERJANJE UČINKOVITOSTI VEZAVE Z REPRESIJO TRANSKRIPCIJE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVI, 79 str., 14 pregl., 36 sl., 6 pril., 64 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Raziskave v biotehnologiji zadnja leta posvečajo vse več pozornosti izboljšavi in optimizaciji biosinteznih poti. Pri diplomskem delu smo se osredotočili na nov pristop izboljšanja biosinteznih poti z vezavo biosinteznih encimov na molekulo DNA. Pripravili smo plazmidne vektorje z geni za himerne proteine, sestavljene iz DNA vezavnih domen (cinkovih prstov) ter encimskih domen. Načrtovali smo sistem za <i>in vivo</i> preverjanje učinkovitosti in specifičnosti njihove vezave. Po potrditvi specifične vezave smo pripravili plazmidne vektorje s programsko DNA, ki vsebuje več kopij vezavnih mest za izbrane cinkove prste. Na primeru biosinteze resveratrola smo pokazali dva do trikratno povečanje količine nastalega produkta ob vezavi dveh biosintetskih encimov na programsko DNA. Naši rezultati potrjujejo, da je z DNA ogrođjem vodena biosinteza potencialno zelo uporaben princip za optimizacijo metabolnih poti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 602.6: 577.2.083(043)=163.6  
CX metabolic engineering/program DNA/plasmids/plasmid vectors/zinc fingers/enzymes/biosynthesis/resveratrol(resveratrol biosynthesis  
AU LEBAR, Tina  
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/ JERALA, Roman (co-advisor)/ TURK, Tom (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2011  
TI RESVERATROL SYNTHESIS BY BINDING CHIMERIC ENZYMES TO DNA AND TESTING BINDING EFFICIENCY THROUGH TRANSCRIPTION REPRESSION  
DT Graduation thesis (university studies)  
NO XVI, 79 p., 14 tab., 36 fig., 6 ann., 64 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the past years, research in biotechnology has been dedicating more and more attention to optimising and improving biosynthetic pathways. In this graduation thesis, we describe a novel approach for improving metabolic flux by spatial arrangement of biosynthetic enzymes on a DNA molecule. We have constructed plasmid vectors with genes encoding chimeric proteins, comprised of zinc finger DNA binding domains and enzyme domains. We tested their binding efficiency *in vivo* with an in-house designed biological system. After confirming their binding, we prepared plasmid vectors containing program DNA with multiple copies of the zinc finger binding sites. On a resveratrol case-study, we have shown a 2-3 fold increase in product yield by binding two biosynthetic enzymes on a DNA scaffold. Our results highlight DNA scaffold-guided biosynthesis as a potentially useful strategy for optimizing metabolic pathways.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XIII</b>
<b>SLOVARČEK .....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN DELOVNE HIPOTEZE .....	1
1.2 CILJI IN NAMEN DELA.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA (DNA) .....	3
<b>2.1.1 Funkcija in zgradba molekule DNA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Alternativna uporaba molekule DNA kot program za celične procese .....</b>	<b>4</b>
2.1.2.1 Programska DNA.....	5
<b>2.1.3 Genska regulacija in DNA vezavni proteini .....</b>	<b>5</b>
2.2 DNA VEZAVNI PROTEINI.....	6
<b>2.2.1 Heliks-zavoj-heliks in levcijska zadrga.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Cinkovi prsti.....</b>	<b>6</b>
2.2.2.1 Odkritje .....	7
2.2.2.2 Poddružine cinkovih prstov .....	7
2.2.2.3 Molekularna zgradba C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> cinkovih prstov in njihova interakcija z molekulo DNA.....	8
2.2.2.5 Sestavljanje cinkovih prstov s poljubnimi prepoznavnimi mesti .....	10
2.2.2.5.1 Zaznavanje bližine z razpolovljenimi proteini .....	11
2.3 PRISTOPI K IZBOLJŠAVAM IN OPTIMIZACIJI BIOSINTEZNIH POTI.....	13
<b>2.3.1 Regulacija genske ekspresije.....</b>	<b>14</b>
2.3.1.1 Optimizacija biosinteze artemisinske kisline v rekombinantnih mikrobih..	14
<b>2.3.2 Približevanje biosintetskih encimov.....</b>	<b>15</b>
2.3.2.1 Fuzije biosintetskih encimov .....	15

2.3.2.2	Vezava biosintetskih encimov na proteinsko ogrodje .....	15
2.3.2.3	Vezava encimov na RNA ogrodje .....	16
<b>2.3.3</b>	<b>Kompartimentalizacija biosintetskih encimov .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>RESVERATROL .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Kemijska struktura in biosintetska pot .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Genski in metabolni inženiring biosinteze resveratrola .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIALI .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Laboratorijska oprema .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Kemikalije .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Raztopine in pufri .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Plazmidi .....</b>	<b>25</b>
3.1.4.1	BioBrick® plazmidni vektorji .....	25
3.1.4.2	pSB1A3 .....	26
3.1.4.3	pSB1K3 .....	26
3.1.4.4	pSB4C5 .....	27
3.1.4.5	pET28a .....	28
3.1.4.6	pET19b .....	28
3.1.4.7	pLysSRARE .....	29
<b>3.1.4</b>	<b>Protitelesa .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Oligonukleotidni začetniki .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Organizmi .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Gojišča .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>METODE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Priprava gojišč .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Osnovne metode molekularnega kloniranja .....</b>	<b>32</b>
3.2.3.1	Priprava kompetentnih celic .....	32
3.2.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	33
3.2.3.3	Agarozna gelska elektroforeza .....	34
3.2.3.4	Izolacija fragmentov DNA iz agaroznih gelov .....	34
3.2.3.5	Restrikcija .....	34

3.2.3.6 Prileganje začetnih nukleotidov .....	35
3.2.3.7 Ligacija .....	35
3.2.3.8 Transformacija kompetentnih celic.....	35
<b>3.2.4 Merjenje beta-galaktozidazne aktivnosti.....</b>	<b>36</b>
3.2.4.1 Izračun podatkov za interpretacijo rezultatov.....	36
<b>3.2.5 Produkcija resveratrola .....</b>	<b>37</b>
3.2.5.1 Ekstrakcija resveratrola.....	37
3.2.5.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	37
<b>3.2.3 Dokazovanje izražanja encimov .....</b>	<b>38</b>
3.2.3.1 Liza celic in soniciranje .....	38
3.2.3.2 Vezava na Ni-NTA polnilo in priprava vzorcev za poliakrilamidno elektroforezo .....	38
3.2.3.3 Priprava gelov in poliakrilamidna gelska elektroforeza .....	38
3.2.3.3 Western prenos.....	39
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1 PREVERJANJE UČINKOVITOSTI VEZAVE CINKOVIH PRSTOV .....	40
4.1.1 Priprava DNA konstruktov.....	42
4.1.2 Učinkovitost in specifičnost vezave izbranih cinkovih prstov .....	43
4.2 SINTEZA RESVERATROLA Z VEZAVO ENCIMOV NA MOLEKULO DNA ..	45
4.2.1 Priprava DNA konstruktov.....	46
4.2.2 Sinteza resveratrola .....	48
4.2.2.1 Izražanje himernih proteinov .....	49
4.2.2.2 Primerjava sinteze resveratrola s programsko DNA in s fuzijo encimov 4CL:STS .....	50
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>51</b>
5.1 RAZPRAVA .....	51
5.1.1 Primerjava DNA ogrodja z ostalimi strategijami približevanja encimov ...	51
5.1.2 Izbira DNA vezavnih domen.....	52
5.1.3 Preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov .....	53
5.1.4 Izbira biosintetske poti .....	54
5.1.5 Sinteza resveratrola z vezavo biosintetskih encimov na molekulo DNA .....	55
5.1.5.1 Izbira seva za produkcijo resveratrola .....	55



5.1.5.2 Vpliv števila dostopnih vezavnih mest za biosintetske encime .....	56
5.1.5.3 Vpliv dolžine vmesnika med vezavnimi mesti .....	57
5.1.5.4 Dokazovanje izražanja biosintetskih encimov .....	58
5.1.5.5 Primerjava sistema z že obstoječimi izboljšavami .....	59
<b>5.1.6 Omejitve sistema .....</b>	<b>63</b>
5.2 SKLEPI .....	60
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>61</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>63</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpomembnejše poddružine cinkovih prstov (Iuchi, 2005).....	7
Preglednica 2: Pregled dosedanjih poskusov rekombinantne sinteze resveratrola glede na izvor biosintetskih encimov 4CL in STS (White , 2009).....	21
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema, navedena po proizvajalcu.....	23
Preglednica 4: Uporabljene kemikalije, navedene po proizvajalcu.....	24
Preglednica 5: Uporabljene raztopine in pufri ter njihova sestava.....	24
Preglednica 6: Uporabljeni plazmidni vektorji.....	25
Preglednica 7: Uporabljena protitelesa.....	30
Preglednica 8: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki.....	30
Preglednica 9: Uporabljeni bakterijski sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	31
Preglednica 10: Sestavine LB gojišč.....	31
Preglednica 11: Sestavine 2YT gojišča.....	31
Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo <i>Taq.</i> ....	33
Preglednica 13: Temperaturni program verižne reakcije s polimerazo <i>Taq.</i> .....	33
Preglednica 14: Uporabljene restikcijske endonukleaze ter njihova prepoznavna mesta....	34

## KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba molekule DNA (Watson in Crick, 1953) .....	4
Slika 2: Shematski prikaz programske DNA z vezanimi himernimi proteini (iGEM, 2010).	5
Slika 3: Strukturna motiva heliks-zavoj-heliks in levcinska zadrga .....	6
Slika 4: Shema molekularne strukture C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> cinkovega prsta z vezanim Zn <sup>2+</sup> (Ganss in Jheon, 2004) .....	8
Slika 5: Vezava Zn <sup>2+</sup> na razvito strukturo cinkovega prsta ter nastanek terciarne strukture za vezavo na DNA (Iuchi, 2005) .....	9
Slika 6: Vezava cinkovih prstov na molekulo DNA (iGEM, 2010) .....	10
Slika 7: Z zaporedjem omogočeno sestavljanje proteinov (Stains in sod., 2005; Ooi in sod., 2006) .....	12
Slika 8: Poenostavljen shematski prikaz urejanja biosintetskih encimov s proteinskim ogrodjem (Dueber in sod., 2010) .....	16
Slika 9: Sestavljanje RNA ogrodij z vezanimi biosintetskimi encimi v fibrile in mreže (Delebecque in sod., 2011) .....	17
Slika 10: Zgradba mikrokompartimentov (Yeates in sod., 2008) .....	18
Slika 11: Kemijske strukture različnih oblik resveratrola (White, 2009) .....	19
Slika 12: Biosintetska pot resveratrola v rastlinah (White, 2009) .....	20
Slika 13: Shematski prikaz sistema BioKock .....	25
Slika 14: Shema plazmidnega vektorja pSB1A3 .....	26
Slika 15: Shema plazmidnega vektorja pSB1K3 .....	27
Slika 16: Shema plazmidnega vektorja pSB4C5 .....	27
Slika 17: Plazmidna mapa vektorja pET28a (BVTech Plasmid, 2011b) .....	28
Slika 18: Plazmidna mapa vektorja pET19b (BVTech Plasmid, 2011a) .....	29
Slika 19: Shema plazmida pLysSRARE (Novy in sod., 2001) .....	29
Slika 20: Poenostavljena shema metod molekularnega kloniranja .....	32
Slika 21: Sistem za preverjanje učinkovitosti vezave cinkovih prstov .....	40
Slika 22: Prileganje oligonukleotidnih začetnikov za sestavitev sintetičnega promotorja p <sub>SYN</sub> z mestom za vstavitev vezavnih zaporedij .....	41
Slika 23: Prileganje oligonukleotidnih začetnikov za sestavitev mesta za vkloniranje cinkovih prstov .....	41

Slika 24: Shematski prikaz postopka priprave končnih konstruktov za preverjanje vezave cinkovih prstov.....	42
Slika 25: Kontrolne restrikcije končnih DNA konstruktov za preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov..	43
Slika 26: Represija $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti s cinkovima prstoma Zif268 in PBSII.....	44
Slika 27: Učinkovitost vezave cinkovih prstov..	44
Slika 28: Specifičnost vezave cinkovih prstov..	45
Slika 29: Na programsko DNA vezana himerna encima za sintezo resveratrola. ....	46
Slika 30: Kontrolna restrikcija DNA konstrukta Zif268:4CL PBSII:STS v ekspresijskem vektorju pET19b..	46
Slika 31: Shematski prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov programskih DNA.....	47
Slika 32: Kontrolne restrikcije DNA konstruktov programskih DNA..	47
Slika 33: HPLC kromatograma ekstraktov resveratrola po 20 urah fermentacije iz sevov BL21(DE3)pLysS (zgoraj) ter Rosetta(DE3)pLysS (spodaj) s transformiranim konstruktom Zif268:4CL PBSII:STS.....	48
Slika 34: Primerjava sinteze resveratrola s himernimi biosintetskimi encimi v prisotnosti programske DNA ter praznega plazmidnega vektorja.....	49
Slika 35: Nitrocelulozna membrana po Western prenosu himernih encimov iz celičnega lizata.....	50
Slika 36: Primerjava sinteze resveratrola s programsko DNA in s fuzijo encimov 4CL in STS.....	50

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidna zaporedja obeh delov sistema za preverjanje učinkovitosti vezave DNA vezavnih proteinov ter vstavljenih cinkovih prstov in njihovih vezavnih zaporedij

Priloga B: Nukleotidna zaporedja genov za cinkove prste ter uporabljenih vezavnih zaporedij

Priloga C: Nukleotidno zaporedje himernih biosintetskih encimov Zif268:4CL in PBSII:STS s promotorjem T7 in terminatorjem T7

Priloga D: Nukleotidno zaporedje programske DNA

Priloga E: Podatki izvedenega  $\beta$ -galaktozidaznega testa za preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov

Priloga F: Optične gostote kultur in površine vrhov resveratrola po 6 urah inkubacije

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
°C	stopinje Celzija
™	blagovna znamka (an. trademark)
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\mu\text{g}$	mikrogram
$\mu\text{l}$	mikroliter
$\mu\text{m}$	mikrometer
2YT	2-kratni kvasni tripton (an. 2x yeast triptone)
4CL	4-kumarat:CoA ligaza
A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
Å	Ångström
an.	angleško
bp	bazni pari
CaCl <sub>2</sub>	kalcijev klorid
C4H	cinamat-4-hidroksilaza
CoA	koencim A
CPI	koktejl proteaznih inhibitorjev
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
g	gram
Gly	glicin
H <sub>2</sub> O	voda
HCl	klorovodikova kislina
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koencim A
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (an. high performance liquid chromatography)

IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
kb	kilobaze
kDa	kilodaltoni
kcal	kilokalorije
KCl	kalijev klorid
l	liter
lat.	latinsko
LB	Luria-Bertani
Leu	levcin
M	molaren
mA	miliamperi
mg	miligram
MgSO <sub>4</sub>	magnezijev sulfat
min	minute
ml	mililiter
mm	milimeter
mM	milimolaren
MnCl <sub>2</sub>	manganov klorid
MOPS	3-(N.morfolino)propansulfonska kislina
mRNA	informacijska RNA (an. messenger RNA)
MQ	dodatno očiščena deionizirana voda (milli Q)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dinatrijev hidrogen fosfat
NaCl	natrijev klorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	natrijev dihidrogen fosfat
ng	nanogram
Ni-NTA	nikelj-nitrilotriacetat
nm	nanometer
nt	nukleotidi
OD	optična gostota (an. optical density)
ONPG	o-nitrofenil galaktozid
Op.	opomba
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza

PAL	fenilalanin amonij liaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (an. polymerase chain reaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije $\text{H}_3\text{O}^+$ ionov
Phe	fenilalanin
pM	pikomolaren
PVC	polivinil klorid
RbCl	rubidijev klorid
RNA	ribonukleinska kislina
rpm	obrati na minuto
RuBisCO	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza oksigenaza
s	sekunde
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	natrijev dodecil sulfat
SEER	z zaporedjem omogočeno sestavljanje proteinov (an. sequence enabled reassembly of proteins)
Ser	serin
sod.	sodelavci
STS	stilben sintaza
TAL	tirozin amonij liaza
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin
TFIIIA	transkripcijski faktor IIIA
Tm	temperatura taljenja (an. melting temperature)
tRNA	prenašalna RNA (an. transfer RNA)
Tyr	tirozin
U	encimske enote
V	volti
$v_{\max}$	maksimalna hitrost pretvorbe substrata
v/v	volumski delež
w/v	masni delež
<i>X.laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
ZiFDB	podatkovna baza cinkovih prstov (an. zinc finger database)
$\text{Zn}^{2+}$	cinkov ion



## SLOVARČEK

### **Cinkov prst**

Cinkovi prsti so majhne proteinske domene za vezavo na DNA, RNA, proteine ter nekatere majhne molekule. Lahko so prisotni v proteinih z različnimi funkcijami, strukturno pa so zelo raznoliki. Vsem je skupna modularna zgradba ter uporaba cinkovih ionov za stabilizacijo tridimenzionalne strukture.

### **Himerni protein**

Himerni oziroma fuzijski protein je protein, sestavljen z združitvijo dveh genov, ki originalno kodirata ločene proteine. S translacijo fuzijskega gena nastane ena sama polipeptidna veriga s funkcionalnimi lastnostmi obeh originalnih proteinov.

### **Metabolni inženiring**

Metabolni inženiring je načrtna sprememba genetske strukture organizma za doseganje določenih fenotipov. To je uporabno predvsem za produkcijo biosinteznih encimov v heterolognih organizmih in s tem doseganje večjih količin produktov, ki jih izraženi encimi sintetizirajo.

### **Programska DNA**

Programska DNA je nekodirajoče zaporedje nukleotidov, sestavljeno iz vezavnih mest za DNA vezavne domene. Ob vezavi na programsko DNA se slednje vežejo na točno določeno razdaljo in v določenem vrstnem redu. V kolikor na DNA vezavne domene priprimo funkcionalne domene, vrstni red vezanih himernih proteinov določa potek dogodkov oziroma biokemijskih reakcij, ki jih izvajajo funkcionalne domene.

### **Resveratrol**

Resveratrol je fenolna spojina, ki jo proizvajajo nekatere višje rastline, najpogostejši vir resveratrola pa je rdeče vino, narejeno iz grozdja. Ima antioksidantsko, protirakavo in protivirusno delovanje, poleg tega pa tudi upočasnjuje staranje, preprečuje poškodbe krvnih žil in nastanek krvnih strdkov ter zmanjšuje raven holesterola v krvi.

## 1 UVOD

Biosinteza je encimsko kataliziran proces v živih celicah, s katerim se enostavni substrati pretvarjajo v kompleksnejše spojine. Proces je običajno sestavljen iz več korakov, pri čemer je produkt ene reakcije substrat za naslednjo. Zadnja leta raziskave v biotehnologiji namenjajo čedalje več pozornosti izboljšavi biosintetskih poti, kar je uporabno predvsem v industrijskih aplikacijah iz vidika povečevanja izkoristkov biosinteze. Na tem področju so že razvili najrazličnejše strategije, najuspešnejša med njimi pa je približevanje biosintetskih encimov z njihovo direktno fuzijo, ali pa z vezavo na proteinsko oziroma RNA ogrodje. Takšen pristop je podoben rešitvam, ki so se že evolucijsko razvile v naravi. Eden takšnih primerov so poliketid sintaze, veliki encimski kompleksi iz večih podenot. Bližina podenot kompleksa zmanjšuje difuzijske omejitve in omogoča hitro produkcijo večjih količin končnih produktov s takojšnjo pretvorbo intermediatov. Takšna ureditev omogoča tudi zaščito nestabilnih intermediatov pred razgradnjo in nevtralizacijo toksičnih intermediatov z njihovo takojšnjo pretvorbo.

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN DELOVNE HIPOTEZE

Dva prek kratkim odkrita in tudi najuspešnejša načina približevanja encimov sta njihovo približevanje z vezavo na proteinsko oziroma RNA ogrodje. Vezava biosintetskih encimov na proteinsko ogrodje zaradi gibljivosti dimerizacijskih domen ne omogoča predvidljivosti tridimenzionalne ureditve vezanih polipeptidov, poleg tega veljajo za vsako dimerizacijsko domeno specifični pogoji, ki omogočajo zvitje in vstop v funkcionalne povezave. Tudi število dobro opredeljenih dimerizacijskih domen je omejeno, medtem ko so biosintezne poti lahko sestavljene iz velikega števila encimov. Ogrodje RNA sicer omogoča prostorsko ureditev encimov, vendar je načrtovanje struktur za njihovo vezavo kompleksno, sploh v primeru vezave več kot dveh encimov.

Predvidevamo, da bi bilo izkoristek določenih biosinteznih poti mogoče izboljšati z vezavo biosinteznih encimov na ogrodje DNA. Ker ima dvojna vijačnica visoko predvidljivo zgradbo, omogoča linearno razporeditev encimov v točno določenem vrstnem redu. DNA vijačnica približno vsakih 10 nukleotidov naredi obrat, zato je mogoča tudi kontrola prostorske ureditve vezanih encimov s spreminjanjem dolžine vmesnika med vezavnimi

mesti. Predvidevamo, da je izkoristek biosinteze odvisen tudi od števila molekul DNA z vezavnimi mesti za encime. V primeru prevelikega števila vezavnih mest bi prišlo do naključne vezave encimov in tako bi bil efekt vezave manjši. Če bi bilo vezavnih mest premalo, pa bi bilo razmerje med encimi in vezavnimi mesti premajhno za opazno izboljšanje, saj bi večina encimov ostala prostih v citoplazmi.

## 1.2 CILJI IN NAMEN DELA

Cilj diplomskega dela je pokazati povečan izkoristek biosinteze resveratrola ob vezavi biosintetskih encimov na ogrodje DNA. Resveratrol bomo sintetizirali s himernimi encimi, sestavljenimi iz DNA vezavnih domen (cinkovih prstov) ter encimskih domen, v celicah *Escherichia coli* ob prisotnosti plazmidnih vektorjev s programsko DNA. Vzporedno bomo primerjali sintezo resveratrola tudi z encimoma 4-kumarat:CoA ligazo in stilben sintazo, neposredno povezanima s peptidnim povezovalcem. Pripravili bomo tudi sistem za meritev specifičnosti in učinkovitosti vezave DNA vezavnih domen. Prek represije reporterskega gena za encim  $\beta$ -galaktozidazo bomo preverili *in vivo* vezavo cinkovih prstov na njihova vezavna zaporedja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 DEOKSIRIBONUKLEINSKA KISLINA (DNA)

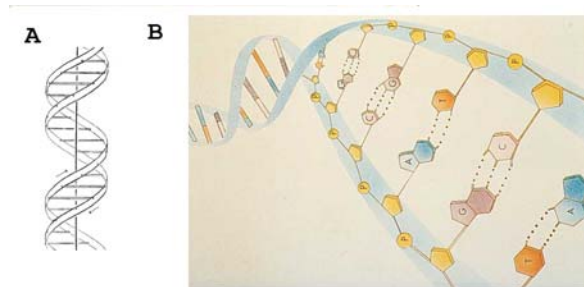
Deoksiribonukleinska kislina (DNA) je makromolekula, ki vsebuje osnovna genetska navodila živih organizmov. Brez težav jo lahko primerjamo z načrtom, receptom oziroma nekakšno kodo, saj vsebuje informacije, potrebne za gradnjo drugih molekul, kot so RNA in proteini (Madigan in Martinko, 2006). Osnovna funkcija molekule DNA je shranjevanje informacij o sestavi celice, posledično pa tudi programiranje procesov v njej.

#### 2.1.1 Funkcija in zgradba molekule DNA

Danes je splošno znano dejstvo, da je osnovna funkcija molekule DNA shranjevanje informacij o sestavi vsake žive celice, pred njenim odkritjem pa je prav nasprotno veljalo prepričanje, da so proteini tisti, ki so bistveni za njeno delovanje (Dahm, 2004). Švicarski zdravnik Friedrich Miescher si je že v 19. stoletju za cilj svojih raziskav zastavil določitev kemijske sestave celic, pri čemer se je osredotočil na preučevanje proteinov. Leta 1869 je pri eksperimentih prvič opazil precipitiranje neznane substance ob dodatku kisline ter glede na znana histokemijska dejstva določil, da izvira iz jedra celice. Snov je poimenoval »nuklein« ter se v svojih nadaljnjih raziskavah posvetil poskusom njene izolacije, kar mu je prvič uspelo leta 1871. Že takrat je kljub pomankljivemu znanju o tej molekuli domneval, da igra centralno vlogo v celici (Dahm, 2004).

Leta 1889 je Richard Altmann preimenoval »nuklein« v »nukleinsko kislino« (Dahm, 2004), naslednjih nekaj desetletij pa tej molekuli raziskovalci niso posvečali velike pozornosti. Šele leta 1928 je Frederick Griffith izvedel poskus, s katerim je pokazal, da so bakterije vrste *Streptococcus pneumoniae* sposobne prenosa genetskih informacij s transformacijo (Griffith in sod., 1928, citirano po Avery in sod., 1944). Po smrti so njegovo delo nadaljevali Avery in sodelavci, ter leta 1944 z različnimi biokemijskimi testi dokazali, da transformirana substanca ni protein, ampak DNA. Da DNA resnično nosi genetsko informacijo, sta leta 1952 dokončno potrdila Hershey in Chase z radioaktivnim označevanjem bakteriofagov T7.

Watson in Crick sta leta 1953 predlagala molekularno strukturo nukleinskih kislin (Slika 1), ki naj bi bile sestavljene iz dveh vijačnic, ovitih okrog iste osi, vsaka pa veriga naj bi bila sestavljena iz fosfatnih diestrskih skupin, povezanih z  $\beta$ -D-deoksifuzanoznimi ostanki ter dušikovimi bazami. Dušikove baze naj bi bile na notranji strani verige, fosfati pa na zunanji. Razdalja med posameznimi bazami naj bi bila  $3,4\text{\AA}$ , kar da 10 baz na en zavoj verige, baze pa naj bi se med seboj parile po ključu purin:pirimidin, specifično adenin s timinom in gvanin s citozinom. Watson in Crick sta za svoje odkritje leta 1962 prejela Nobelovo nagrado, njun model molekule DNA pa je danes splošno priznan in sprejet v svetu molekularne biologije. Poznavanje strukture in funkcije molekule DNA je bistveno spremenilo svet biologije in znanosti v splošnem.



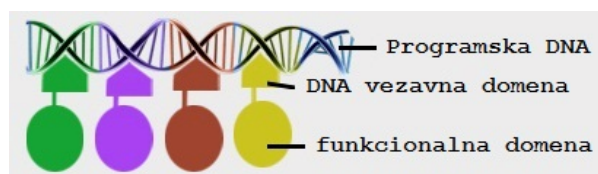
**Slika 1: Zgradba molekule DNA. A) shematski model molekule DNA (Watson in Crick, 1953).** Trakova predstavljata verigi sladkorjev s fosfatnimi ostanki, horizontalne črte pa pare baz, ki stabilizirajo verigi. Vertikalna črta predstavlja osnovno os. B) poenostavljena shema molekularne strukture DNA.

### 2.1.2 Alternativna uporaba molekule DNA kot program za celične procese

Tripleti nukleotidov kodirajo informacijo, ki določa vrstni red vključevanja aminokislin v polipeptidne verige oziroma proteine. Genski kod omogoča 64 kombinacij tripletov, ki kodirajo 20 različnih aminokislin (Madigan in Martinko, 2006). Tako molekula DNA že v osnovi funkcionira kot program, ki določa sestavo vseh proteinov, katere celica sintetizira. Namesto tripletov nukleotidov pa lahko osnovno enoto programa predstavlja večje število nukleotidov, ki služijo kot vezavna mesta za DNA vezavne proteine. Takšno nukleotidno zaporedje torej določa ureditev in vrstni red DNA vezavnih proteinov, vezanih na dvojno vijačnico, v kolikor pa na vezavne domene pripnemo še kakršnekoli funkcionalne domene, pa nukleotidno zaporedje molekule DNA določa tudi ureditev in vrstni red teh (iGEM, 2010).

### 2.1.2.1 Programska DNA

Programska DNA (Slika 2) je nekodirajoče zaporedje nukleotidov, sestavljeno iz vezavnih mest za DNA vezavne proteine. V primeru da so slednji povezani s funkcionalnimi domenami, se ob vezavi na predvidena mesta znajdejo blizu skupaj in sicer v vnaprej določenem vrstnem redu. S spreminjanjem vezavnih mest na programski DNA je mogoče spremeniti vrstni red vezanih himernih proteinov in posledično potek dogodkov oziroma reakcij, ki jih izvajajo funkcionalne domene (iGEM, 2010).



Slika 2: Shematski prikaz programske DNA z vezanimi himernimi proteini (iGEM, 2010).

### 2.1.3 Genska regulacija in DNA vezavni proteini

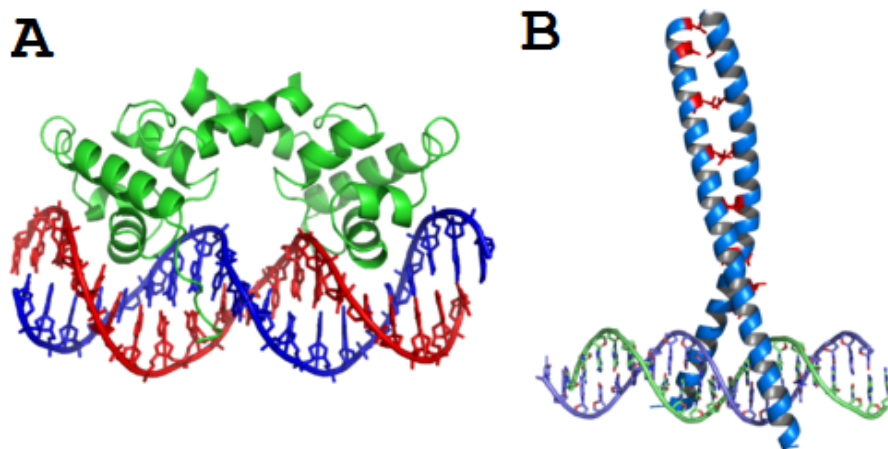
Večino proteinov predstavljajo encimi, ki izvajajo na stotine različnih biokemijskih reakcij v celicah. Da bi bili mikroorganizmi uspešni v naravi, se morajo hitro odzivati na spremembe okolja. Za maksimalno izrabo razpoložljivih virov in učinkovit nadzor procesov morajo celice tako nadzorovati vrsto in količino makromolekul, ki jih sintetizirajo. Obstajata dva glavna mehanizma regulacije v celicah – eden nadzoruje aktivnost encimov, drugi pa njihovo količino. Nadzor encimske aktivnosti se lahko zgodi le posttranslacijsko s kovalentnimi ali nekovalentnimi modifikacijami encimov, nasprotno pa celice količino encimov lahko nadzorujejo bodisi na nivoju translacije, bodisi na nivoju transkripcije s proteini, ki se lahko vežejo na molekulo DNA (Madigan in Martinko, 2006).

DNA vezavni proteini so proteini, ki vsebujejo domene s specifično ali splošno afiniteto do eno- ali dvovertične DNA. Največkrat je njihova funkcija regulacija transkripcije, lahko pa imajo vlogo tudi pri podvajanju DNA, popravljalnih mehanizmih ter modifikaciji DNA (restriktaze, metilaze...). Znanih je več strukturnih tipov DNA vezavnih domen, najbolj razširjeni in preučeni pa so motivi heliks-zavoj-heliks, levcinska zadruga in cinkovi prsti (Madigan in Martinko, 2006).

## 2.2 DNA VEZAVNI PROTEINI

### 2.2.1 Heliks-zavoj-heliks in levcinska zadruga

Heliks-zavoj-heliks in levcinska zadruga sta dva od treh najbolj razširjenih motivov DNA vezavnih domen. Heliks-zavoj-heliks motiv (Slika 3a) vsebuje prepoznavno  $\alpha$  vijačnico, ki interagira z molekulo DNA, ta pa je s tremi aminokislinskimi ostanki povezana s stabilizirajočo  $\alpha$  vijačnico, ki stabilizira prvo prek hidrofobnih interakcij. Dve stabilizirajoči vijačnici se povežeta med seboj, in nastane homodimer, ki se lahko veže na molekulo DNA. Levcinska zadruga (Slika 3b) vsebuje eno  $\alpha$  vijačnico z regijami, kjer so vsakih 7 aminokislin razporejeni levcinski ostanki. Ti reagirajo med seboj in tako povežejo dve vijačnici, ki tako stabilizirata druga drugo in se vežeta na DNA (Madigan in Martinko, 2006).



**Slika 3: Strukturna motiva heliks-zavoj-heliks in levcinska zadruga.** A) DNA vezavna domena lambda represorja iz dveh heliks-zavoj-heliks motivov, vezana na molekulo DNA. B) homodimer  $\alpha$  heliksov, ki sestavlja levcinsko zadrugo, vezan na molekulo DNA.

### 2.2.2 Cinkovi prsti

Cinkovi prsti so majhne proteinske domene, ki za stabilizacijo potrebujejo cink. Strukturno so zelo raznoliki, prisotni pa so v proteinih z različnimi funkcijami, kot naprimer podvajanje DNA, transkripcija, translacija, signaliziranje... (Sri Krishna in sod. 2003).

### 2.2.2.1 Odkritje

V 80ih letih 20. stoletja so znanstveniki začeli preučevati 5S RNA gene južnoafriške vodne žabe *Xenopus laevis*. Picard in Wegnez (1979) sta ugotovila, da je za njihovo prepisovanje potrebna vezava proteinskega faktorja, ki sta ga poimenovala transkripcijski faktor IIIA (TFIIIA). Po izolaciji proteina iz oocit *X. laevis* so Miller in sodelavci (1985) odkrili ponavljajoč motiv v njegovi strukturi, ki so mu v laboratorijskem žargonu rekli kar cinkovi prsti zaradi vsebnosti cinka ter načina vezave na DNA. V naslednjih letih so odkrili veliko število proteinov s podobno zgradbo, ki se lahko vežejo na nukleinske kisline, proteine ali majhne molekule. Takšne proteine uvrščamo v proteinsko družino cinkovih prstov (Klug, 2005).

### 2.2.2.2 Poddružine cinkovih prstov

Z odkrivanjem novih cinkovih prstov se je raznolikost znotraj družine močno povečala, sledilo pa je seveda razvrščanje v poddružine. Cinkovi prsti posameznih poddružin se med seboj razlikujejo v funkciji cinkovih prstov, njihovi ohranjeni aminokislinski sestavi in posledično vezavi cinkovih ionov, ter predvsem vrsti molekul, na katere se vežejo (Preglednica 1).

**Preglednica 1: najpomembnejše poddružine cinkovih prstov (Iuchi, 2005).**

<b>Poddružina</b>	<b>Vezavna molekula</b>
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	DNA in RNA
CCHC	genomska RNA retrovirusov
CCCH	mRNA
LIM	različni proteini
RING	različni proteini
TAZ	transkripcijski faktorji
FYVE	fosfatidil inozitol trifosfat

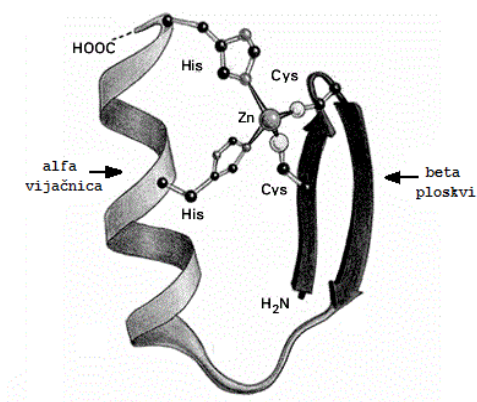
Najštevilčnejša poddružina cinkovih prstov, ki se veže na molekule DNA, je poddružina C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> cinkovih prstov. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> cinkovi prsti so tako najprimernejši za uresničitev cilja te diplomske naloge, zato se bom v nadaljevanju osredotočila le na to poddružino.



### 2.2.2.3 Molekularna zgradba $C_2H_2$ cinkovih prstov in njihova interakcija z molekulo DNA

Pred odkritjem TFIIIA je veljalo, da ima večina DNA vezavnih domen stuktorni motiv heliks-zavoj-heliks. Že glede na aminokislinsko zaporedje pa se je izkazalo, da je TFIIIA povsem drugačne zgradbe – jasno razvidna je bila zgradba iz več modularnih domen, vsaka dolga okrog 30 aminokislin. Berg je leta 1988 s pomočjo primerjave z aminokislinskimi zaporedji drugih proteinov, ki vežejo kovine, predlagal tridimenzionalno zgradbo cinkovih prstov. Sestavljeni naj bi bili iz dveh  $\beta$  ploskev in  $\alpha$  vijačnice, kar so kasneje z jedrsko magnetno resonanco potrdili Lee in sodelavci (1989).

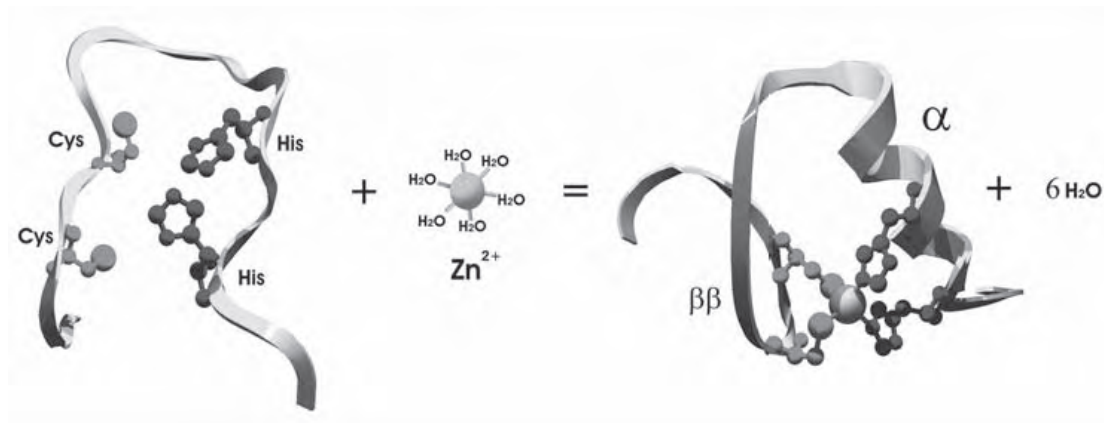
$C_2H_2$  cinkovi prsti tvorijo največjo poddružino cinkovih prstov in so prisotni tako v prokariotih kot v evkariotih, kodira pa jih več kot 2% vseh človeških genov (več kot 700) (Dhanasekaran in sod., 2005; Iuchi, 2005). Cinkovi prsti so lahko v splošnem v treh oblikah – razviti, zviti ter vezani na molekulo DNA. Motiv  $C_2H_2$  cinkovih prstov ima vsa informacijo za pravilno zvitje, vendar za to potrebujejo cinkov ion ( $Zn^{2+}$ ), ki ohranja protein v pravi konformaciji za vezavo na molekulo DNA (Cox in McLendon, 2000).



Slika 4: Shema molekularne strukture  $C_2H_2$  cinkovega prsta z vezanim  $Zn^{2+}$  (Ganss in Jheon, 2004).

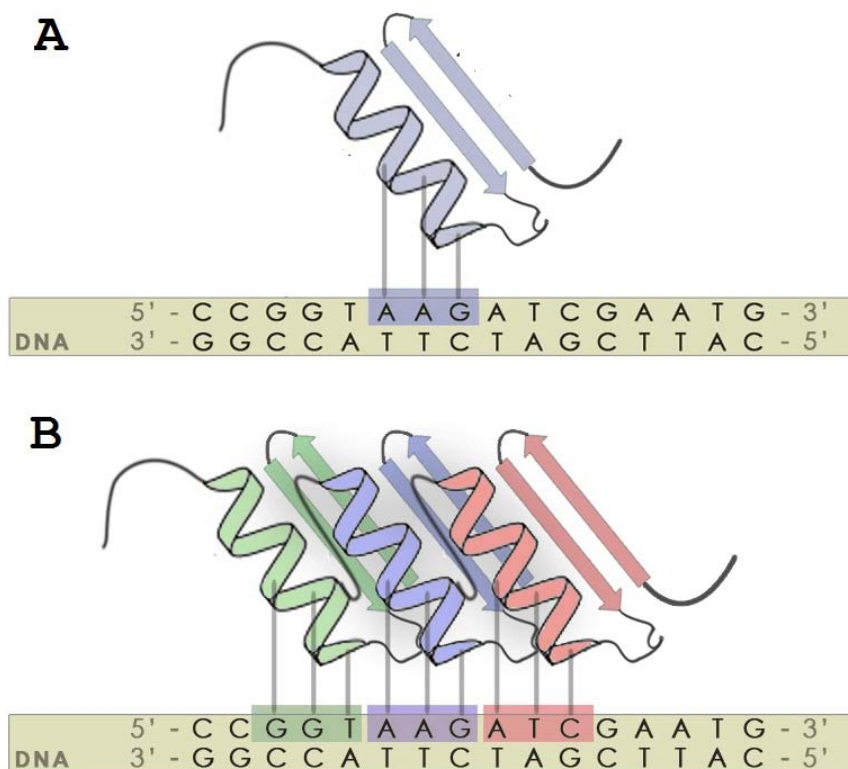
Vsak modul veže  $Zn^{2+}$  prek dveh cisteinskih ostankov na  $\beta$  ploskvi in dveh histidinskih ostankov na  $\alpha$  vijačnici (Slika 4), pri tem pa se sprostijo 6 molekul vode (Slika 5). Od tod tudi ime poddružine ( $C_2H_2$  oziroma  $Cys_2$ - $His_2$ ).  $C_2H_2$  cinkovi prsti so tipično sestavljeni iz 20 do 30 aminokislinskih ostankov in jih pogosto opisujemo tudi kot  $X_2CX_{2-4}CX_{12}HX_{2-8}H$ , s čimer pokažemo intervale med aminokislinskimi ostanki za vezavo cinka (Pavlovich in

Pabo, 1991). Poleg cisteinskih in histidinskih ostankov so za vezavo  $Zn^{2+}$  pomembne še tri ohranjene aminokisliline, Tyr6, Phe17 in Leu23 (Iuchi, 2005). Sprememba Gibbsove proste energije ob vezavi  $Zn^{2+}$  na en cinkov prst znaša okrog -8,8 kcal/mol in je konstantna v temperaturnem območju med 5 in 45°C, (Lachenmann in sod., 2002), kar pomeni, da je terciarna struktura cinkovih prstov v bioloških sistemih zelo stabilna.



Slika 5: vezava  $Zn^{2+}$  na razvito strukturo cinkovega prsta ter nastanek terciarne strukture za vezavo na DNA (Iuchi, 2005).

$C_2H_2$  cinkovi prsti se vežejo na veliki jarek molekule DNA tako, da se ovijejo okrog vijačnice. Ob vezavi se molekula DNA spremeni v rahlo odvito B-obliko, da se ohrani širina velikega jarka. Takšna oblika ima namesto običajnih 10,5 11,3 baznih parov na obrat (Pabo in sod., 2001). Specifičnost vezave določajo aminokislinski ostanki  $\alpha$  vijačnice, ki se vežejo z nukleotidi prek vodikovih vezi in nespecifičnih hidrofobnih interakcij. Kristalna struktura Zif268-DNA kompleksa kaže, da vsak posamezen prst veže triplet nukleotidov dvovertične DNA (Slika 6) s specifičnimi kontakti N-terminalnega konca  $\alpha$ -vijačnice (Pavletich in Pabo, 1991). K vezavi prispevajo tudi kontakti s fosfatno hrbtenico molekule DNA, ki sicer za specifičnost niso pomembni. Med posameznimi prsti so namreč peptidni povezovalci, pri večini  $C_2H_2$  cinkovih prstov iz ohranjenega aminokislinskega zaporedja TGEKP (Wolfe in sod., 2000). Ti so v raztopini brez DNA fleksibilni, ob vezavi na molekulo DNA pa se lizin poveže s fosfati, treoninski in glicinski ostanek pa stabilizirata  $\alpha$  vijačnico, kar ojača vezavo in poveča stabilnost kompleksa DNA-protein (Wolfe in sod., 2000).



**Slika 6: Vezava cinkovih prstov na molekulo DNA.** A) shematski prikaz motiva cinkovega prsta.  $\alpha$  vijačnica veže triplet nukleotidov na molekuli DNA. B) shematski prikaz DNA vezavne domene iz treh cinkovih prstov. Vsaka  $\alpha$  vijačnica veže triplet nukleotidov na molekuli DNA, prepoznavno mesto domene pa je tako dolgo 9 nukleotidov (iGEM, 2010).

#### 2.2.2.5 Sestavljanje cinkovih prstov s poljubnimi prepoznavnimi mesti

Kljub veliki raznolikosti strukturnih domen DNA vezavnih proteinov, je specifičnost interakcij med proteinom in molekulo DNA najpogosteje odvisna od komplementarnosti površin  $\alpha$ -vijačnice in velikega grabna DNA (Pabo in Sauer, 1992). Glede na slednje dejstvo se zdi mogoče opisati stike med aminokislinami in nukleotidi s preprostimi pravili, ki jih lahko združimo v »prepoznavno kodo«.

$C_2H_2$  cinkovi prsti so preprosta in raznolika osnova za načrtovanje novih DNA vezavnih proteinov, ki lahko prepoznajo katerokoli želeno zaporedje nukleotidov (Pabo in sod., 2001; Isalan in Choo, 2001). Posebna koda, ki povezuje aminokislinske ostanke cinkovih prstov s specifičnim zaporedjem molekule DNA, je bila predlagana za številne cinkove

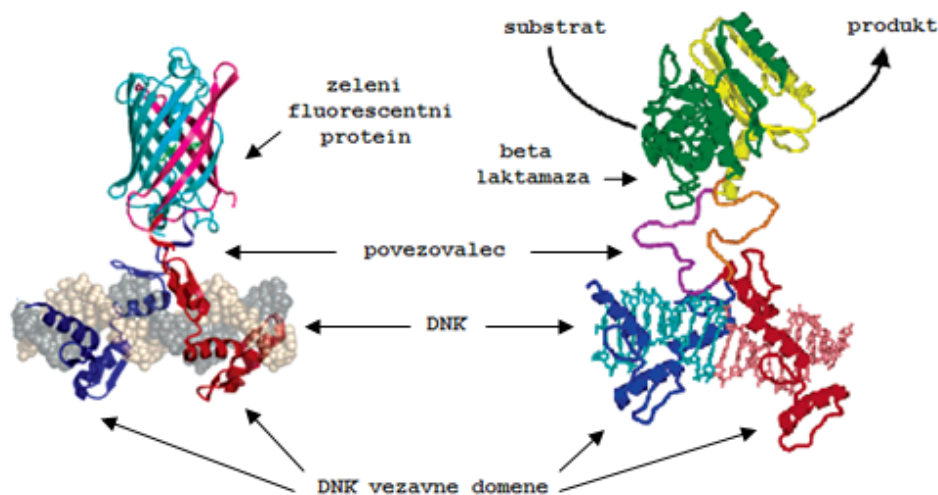
prste (Choo in Klug, 1994; Jamieson in sod., 1994). Z uporabo te kode je v zadnjih dveh desetletjih več raziskovalnih skupin pripravilo nove peptide z domenami cinkovih prstov, ki se lahko vežejo na vnaprej določeno zaporedje nukleotidov.

Razvozlanje kristalne strukture cinkovega prsta Zif268 v kompleksu z DNA (Pavletich in Pabo, 1991) je bila osnova za mnoge nadaljnje študije. Zif268 se je izkazal kot zelo uporaben modelni sistem za razumevanje interakcij cinkov prst-DNA. V posameznem prstu trije aminokislinski ostanki na pozicijah -1, +3 in +6  $\alpha$ -vijačnice vežejo tri nukleotide na eni verigi dvoverižne DNA, ostali prsti pa vežejo sosednja, a neodvisna zaporedja nukleotidov (Corbi in sod., 2005). Dejarlais in Berg (1992a, 1992b, 1993) sta bila med prvimi, ki sta na osnovi usmerjene mutageneze  $\alpha$ -vijačnice razvila cinkov prst-DNA prepoznavno kodo. Korak naprej je bil selekcijski sistem fagnega prikaza, ki je omogočil izolacijo zelenih mutant z novo specifičnostjo izmed ogromnega števila naključnih cinkovih prstov (Jamieson in sod., 1994; Choo in Klug, 1994). Jamieson in sodelavci (1994) so ustvarili celotno knjižnico Zif268 mutant z naključnimi 4 pozicijami prvega prsta in jih selekcionirali z različnimi tarčnimi molekulami DNA.

Zaradi vezave na asimetrična zaporedja, v nasprotju z levcinsko zadrigo in heliks-zavoj-heliks motivom, pa se ponuja dobro izhodišče za načrtovanje cinkovih prstov tudi z daljšimi prepoznavnimi mesti. Prepoznavanje daljših nukleotidnih zaporedij je v naravi precej redko, celo TFIIIA z 9 prsti se veže na krajša zaporedja zaradi uporabe le določenih prstov (Dhanasekaran in sod., 2005; Klug, 2005). Najpogostejši so proteini s tremi prsti, ki vežejo 9 nukleotidov dolga zaporedja. Z združitvijo dveh takšnih cinkovih prstov bi tako dobili šestprste DNA vezavne domene, ki bi prepoznavale 18 nukleotidov dolga zaporedja. Statistično preračunano je takšna dolžina zadostna, da se enako zaporedje ne pojavi v celotnem genomu rastlin, živali in tudi človeka (Choo in Isalan, 2000; Dhanasekaran in sod., 2005). Takšni proteini bi bili uporabni naprimer v genski terapiji, saj bi lahko prepoznavali katerokoli nukleotidno zaporedje v genomu celotnega organizma (Dhanasekaran in sod., 2005). Do danes je že več raziskovalnih skupin sestavilo cinkove prste z daljšimi prepoznavnimi zaporedji ter dokazalo njihovo učinkovito vezavo (Dhanasekaran in sod., 2005; Kim in Pabo, 1998; Liu in sod., 1997).

### 2.2.2.5.1 Zaznavanje bližine z razpolovljenimi proteini

Z zaporedjem omogočeno sestavljanje proteinov (v nadaljevanju SEER; an. SEquence Enabled Reassembly of proteins) je pristop, ki temelji na sestavljanju razpolovljenih proteinov, povezanih z DNA vezavnimi domenami. Ob vezavi takšnih himernih proteinov na molekulo DNA se razpolovljeni protein lahko ponovno sestavi. Ta princip je bil že večkrat dokazan z različnimi razpolovljenimi proteini (Slika 7), kot naprimer zeleni fluorescentni protein (Stains in sod., 2005) in  $\beta$ -laktamaza (Ooi in sod., 2006), vezanimi na cinkove prste.



**Slika 7: Z zaporedjem omogočeno sestavljanje proteinov.** Levo: sestavitev polovic zelenega fluorescentnega proteina ob vezavi himernih proteinov na molekulo DNA (Stains in sod, 2005). Desno: sestavitev polovic  $\beta$ -laktamaze ob vezavi himernih proteinov na molekulo DNA (Ooi in sod., 2006).

SEER je uporabna tehnika za *in vivo* detekcijo specifičnih zaporedij DNA, kar ima potencial tudi v raziskavah na področju rakavih obolenj (Stains in sod., 2005). Vendar pa te aplikacije temeljijo na zaporedjih DNA, ki so v celici že naravno prisotna. Mogoče pa je natančno načrtovati molekulo DNA za vezavo himernih proteinov ter jo dodati v bakterijske celice, kjer funkcioniira kot napisan program, ki vnaprej določa procese oziroma reakcije, ki se bodo zgodile v celici (iGEM, 2010; poglavje 2.1.2.1).

## 2.3 PRISTOPI K IZBOLJŠAVAM IN OPTIMIZACIJI BIOSINTEZNIH POTI

Kemijska sinteza organskih spojin, koristnih za človeka, je velikokrat tehnološko zahtevna, draga, ter pogosto škodljiva za okolje. Zadnjih nekaj desetletij se je zato v biotehnologiji močno razširila uporaba mikrobov kot producentov velikega števila terapevtsko pomembnih produktov, biogoriv in drugih spojin (Dueber in sod., 2010). Na prvi pogled je tudi ta tehnologija omejena, saj mikrobi večinoma snovi proizvajajo v zelo majhnih količinah (Anthony in sod., 2009), na omenjen način pa je tudi težko pridobivati spojine rastlinskega ali živalskega izvora. Vendar pa v zadnjih letih z razvojem metabolnega inženiringa te omejitve hitro izginjajo.

Metabolni inženiring je načrtna sprememba genetske arhitekture organizma za doseganje specifičnih fenotipov (Vemuri in Aristidou, 2005), kar je uporabno predvsem za produkcijo biosintetskih encimov v heterolognih gostiteljih in s tem doseganje velikih količin produktov, ki jih izraženi encimi sintetizirajo. Metabolni inženiring mikroorganizmov je zelo obetavno področje biotehnologije, vendar se pojavljajo določene omejitve, zaradi katerih je potrebna optimizacija. Doseganje velikih količin končnih produktov zahteva uravnoteženje metabolnih tokov vseh encimskih reakcij v biosintetski poti in omejitev kopičenja celici škodljivih intermediatov reakcij (Dueber in sod., 2010; Fan in sod., 2010).

Do danes so bile razvite najrazličnejše strategije uravnoteževanja metabolnih tokov. Najpomembnejše med njimi so regulacija genske ekspresije (Anthony in sod., 2009; Dueber in sod., 2010; Kizer in sod., 2008; Vemuri in Aristidou, 2005) ter izboljševanje lastnosti encimov z usmerjeno evolucijo (Dueber in sod., 2010), eden najnovejših in najučinkovitejših pristopov k izboljševanju izkoristkov biosintetskih poti pa je približevanje encimov, bodisi s fuzijami biosintetskih encimov (Agapakis in sod., 2010), bodisi z njihovo vezavo na proteinsko ogrodje (Dueber in sod., 2010) ter RNA ogrodje (Delebecque in sod., 2011). Kot zelo obetaven princip za usmerjanje metabolnih poti se kaže tudi kompartmentalizacija biosintetskih encimov z uporabo metabolosomov (Fan in sod., 2010; Yeates in sod., 2008), ki pa so zaenkrat še premalo preučeni.

### 2.3.1 Regulacija genske ekspresije

V naravi je regulacija genske ekspresije tista, ki omogoča nastanek ustreznih količin encimov. Ker želimo z metabolnim inženiringom doseči večje količine končnih produktov, je ekspresija encimov običajno zelo visoka. To za celico pomeni pomembno metabolno obremenitev zaradi velike porabe nukleotidov in aminokislin pri njihovi sintezi. Zaradi tega se lahko v produkcijskem sevu sprožijo stresni odzivi in posledično pride do slabše produkcije zelene spojine, poleg tega lahko pri sintezi nastajajo celici toksični intermedii, ki upočasnijo ali ustavijo njeno rast (Dueber in sod., 2010).

Metabolni inženiring novih oziroma modificiranih biosintetskih poti je pogosto zahteven in zapleten proces, sploh takrat, kadar optimalna razmerja količin encimov niso znana. Neravnotežja v genski ekspresiji lahko vodijo v prekomerno ali nezadostno produkcijo biosintetskih encimov, kar pomeni manjše količine zelenih končnih produktov (Anthony in sod., 2009; Dueber in sod., 2010). Metode, ki se uporabljajo za izboljšanje in optimizacijo takšnih biosintetskih poti vključujejo optimizacijo rabe kodonov ter povečanje ali zmanjšanje produkcije limitnih encimov in s tem eliminacijo kopičenja toksičnih intermediatov (Anthony in sod., 2009; Dueber in sod., 2010).

#### 2.3.1.1 Optimizacija biosinteze artemisinske kisline v rekombinantnih mikrobih

Eden od uspešnejših projektov na področju metabolnega inženiringa je bila produkcija artemisinske kisline, prekursorja antimalaričnega zdravila artemisininina, v kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* prek spremembe uravnavanja genov mevalonatne poti in vstavitve genov rastline *Artemisia annua* v gostiteljski organizem (Ro in sod., 2006). Biosintetsko pot za sintezo artemisininske kisline so kasneje poskušali sestaviti tudi v *E.coli* (Kizer in sod., 2008). Ugotovljeno je bilo, da je pri tem rast bakterij močno upočasnjena zaradi inhibicije biosinteze maščobnih kislin ob kopičenju intermedjata HMG-CoA (Kizer in sod., 2008). Anthony in sodelavci (2009) so sintezo artemisinske kisline kasneje optimizirali tako, da so za ekspresijo encimov uporabili plazmide z različnimi števili kopij ter različno močne promotorje in ribosomska vezavna mesta in tako z zmanjšanjem količine toksičnega intermedjata 7-krat povečali njeno produkcijo.

### 2.3.2 Približevanje biosintetskih encimov

Že narava je razvila različne strategije usmerjanja substratov v določene reakcije. Tako delujejo naprimer poliketid sintaze in celulosomi (Fan in sod., 2010). Pri teh je s povezovanjem več encimov v komplekse doseženo zblizanje aktivnih mest. Na podoben način tudi triptofan sintaza in karbamoil fosfat sintetaza (Dueber in sod., 2010) tvorita nekakšne tunele za približevanje aktivnih mest. Takšno urejanje encimov ima več prednosti. To so preprečevanje izgube intermediatov zaradi difuzije ali kompetitivnih metabolnih poti, zaščita nestabilnih intermediatov pred razgradnjo ali razpadom ter takojšnjo pretvorbo toksičnih intermediatov (Dueber in sod., 2010).

#### 2.3.2.1 Fuzije biosintetskih encimov

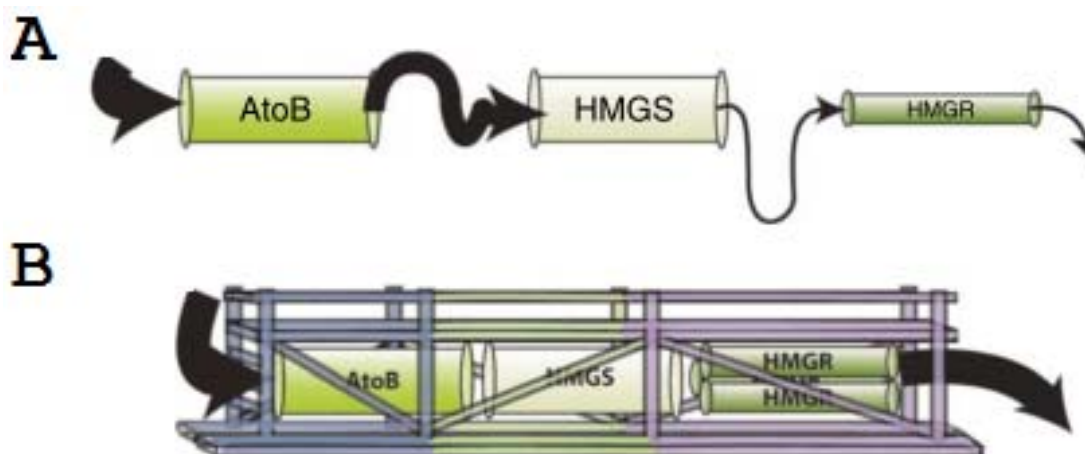
Najpogostejša metoda, ki se že uporablja za usmerjanje substratov v določene reakcije, je imobilizacija encimov (Dueber in sod., 2010). Vendar je ta metoda ob povečanju obsega (an. »scale-up«) cenovno zelo neugodna, poleg tega pa je kompleksna predvsem zaradi *in vitro* poteka in nezmožnosti samopomnoževanja. Prenos principa usmerjanja substratov v reakcije je že bil prenešen v žive celice, in sicer prek fuzij proteinov. Gre za proteinske fuzije na genetskem nivoju, pri katerih je med oba encima vnešen peptidni povezovalac. Ti eksperimenti so dosegali mešane uspehe, poleg tega pa kovalentne fuzije lahko onemogočijo pravilno zvijanje proteinov (Dueber in sod., 2010). Agapakis in sodelavci (2010) so naprimer pokazali skoraj petkratno povečanje produkcije vodika s fuzijo dveh encimov (hidrogenaze in feredoksina), pokazali pa so tudi, da efekt pada s fuzijo več kot dveh encimov ter s podaljševanjem peptidnega povezovalca med encimoma.

#### 2.3.2.2 Vezava biosintetskih encimov na proteinsko ogrodje

Dueber in sodelavci (2010) so razvili *in vivo* sistem za izboljšanje in pospeševanje metabolnega toka v *E.coli*, tako da so biosintetske encime mevalonatne poti vezali v sintetične komplekse z uporabo dobro okarakteriziranih proteinskih interakcijskih domen. Na tako ustvarjeno proteinsko ogrodje so vezali več encimov v različnih stehiometrijah ter v najboljšem primeru dosegli 77-krat večjo produkcijo mevalonata. Enak princip vezave



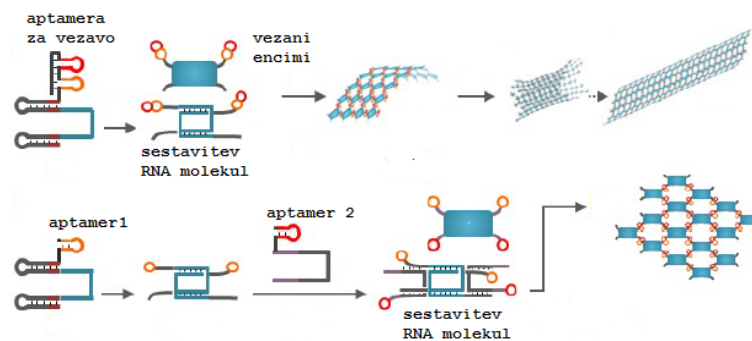
biosintetskih encimov na proteinsko ogrodje so uporabili tudi za sintezo glukarne kisline. V tem primeru jim je uspelo sintetizirati 3-krat več produkta v primerjavi s prostimi encimi, kljub temu, da je bila produkcija že v začetku visoka. Sintetično proteinsko ogrodje so uporabili tudi Agapakis in sodelavci (2010) za produkcijo vodika v *E.coli* in tako dosegli trikratno povečanje količine nastalega vodika.



**Slika 8: Poenostavljen shematski prikaz urejanja biosintetskih encimov s proteinskim ogrodjem (Dueber in sod., 2010).** A) Shema metabolnega toka prostih encimov; puščice prikazujejo pot intermediatov. B) Shema metabolnega toka encimov, urejenih na proteinskem ogrodju; intermediatom ni potrebno prepotovati daljših razdalj med encimi.

### 2.3.2.3 Vezava encimov na RNA ogrodje

Delebecque in sodelavci (2011) so pred kratkim objavili članek, v katerem opisujejo vezavo biosintetskih encimov za sintezo vodika na RNA ogrodje *in vivo*. Sintetizirali so molekule RNA, ki tvorijo eno- in dvodimenzionalne strukture mrež in fibril, ter uporabili dobro okarakterizirane RNA aptamere za vezavo proteinov, spojenih z biosintetskimi encimi. S takšnim približevanjem encimov so dosegli do 24-kratno povečanje produkcije vodika v *E.coli*.

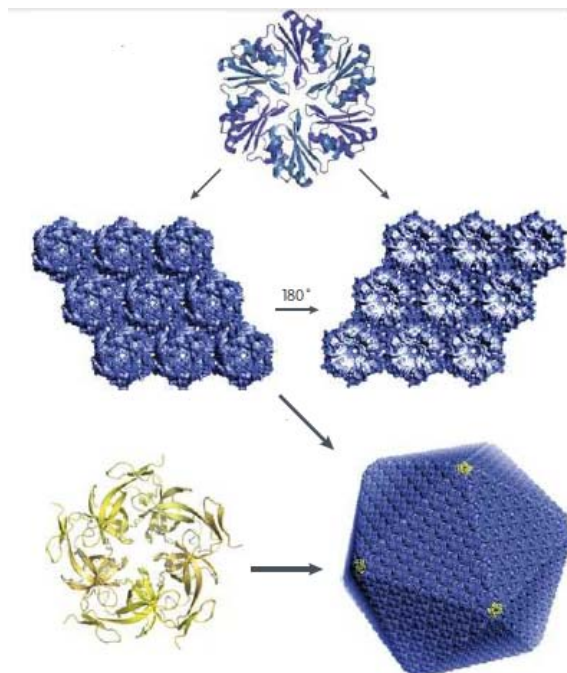


**Slika 9: Sestavljanje RNA ogrodij z vezanimi biosintetskimi encimi v fibrile in mreže.** Biosintetski encimi, spojeni z aptamer-vezavnimi proteini se vežejo na RNA aptamere, molekule s temi se nato sestavijo v predvidene strukture in encimi so fiksirani na določeni razdalji, s tem pa je pospešen in urejen metabolni tok (Delebecque in sod., 2011).

### 2.3.3 Kompartimentalizacija biosintetskih encimov

Še ena naravna rešitev problemov, ki se pojavljajo pri metabolnem inženiringu, so bakterijski znotrajcelični mikrokompartmenti. Ti so sestavljeni iz na tisoče proteinskih podenot, v svoji notranjosti pa vsebujejo funkcionalno povezane encime ter tako služijo kot organeli za osamitev specifičnih metabolnih poti, tudi takšnih s toksičnimi ali nestabilnimi intermediati (Fan in sod., 2010; Yeates in sod., 2008). Najbolj preučeni takšni mikrokompartmenti so karboksisomi cianobakterij in nekaterih kemoavtotrofov. Ti vsebujejo encim RuBisCO in ogljikovo anhidrazo ter z njuno kolokalizacijo na omejenem prostoru povečajo učinkovitost fiksacije ogljikovega dioksida (Yeates in sod., 2008).

Čeprav so bili mikrokompartmenti odkriti in opisani že pred štirimi desetletji (Yeates in sod., 2008), pa šele v zadnjih letih začnemo razumeti njihovo delovanje in funkcijo. Kolokalizacija encimov določene metabolne poti lahko močno poveča njeno učinkovitost, saj je produkt ene encimske reakcije takoj in v visoki koncentraciji na voljo za naslednjo reakcijo (Fan in sod., 2010; Yeates in sod., 2008). V kolikor so ti obdani s pregrado, ki ima specifične transportne oziroma prepustne lastnosti, je to še večja prednost (Yeates in sod., 2008). Zadnje raziskave so pokazale, da je za pakiranje encimov v takšne kompartmente potreben N-terminalni peptid (Fan in sod., 2010), kar je odlično izhodišče za nadaljnje raziskave in potencialno uporabo mikrokompartmentov v biotehnologiji za povečevanje učinkovitosti biosintetskih poti (Fan in sod., 2010; Yeates in sod., 2008).



**Slika 10: Zgradba mikrokompartmentov (Yeates in sod., 2008).** Heksamerni proteini (modro) se sestavljajo v večje proteinske komplekse, ki se povežejo z pentamernimi proteini (rumeno) v pravilne zaprte strukture.

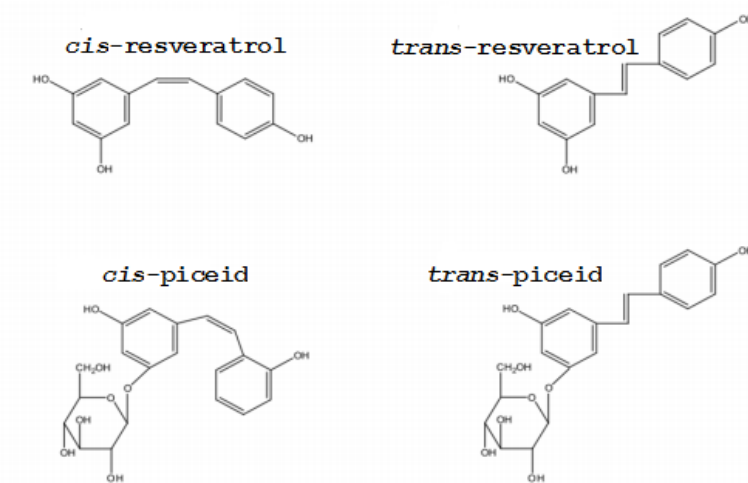
## 2.4 RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-*trans*-stilben) je fenolna spojina, ki jo proizvajajo nekatere višje rastline. Najdemo ga v grozdju, arašidih, evkaliptusu, rži in drugih rastlinah (Wang in sod., 2010). Je stranski produkt rastlinskega odziva na stres in ima močno antimikrobno aktivnost (Langcake in Pryce, 1976), ter tako igra veliko vlogo pri odpornosti rastlin na različne bolezni. Najpogostejši vir resveratrola je rdeče grozdje. Resveratrol lahko najdemo v vseh rastlinskih tkivih trte, največje koncentracije pa so v koži grozdnih jagod (Soleas in sod., 1997). Količine resveratrola v rdečem vinu variirajo od 0,2 do 5,8 mg/l, kar je odvisno od vrste grozdja, lokacije, letnega časa in drugih dejavnikov (Gu in sod., 1999). Ugotovljeno je bilo, da glivna okužba med razvojem grozdov drastično poveča raven resveratrola, z dodatkom fungicidov in drugih protiglivnih sredstev pa se njegova količina močno zmanjša (Magee in sod., 2002).

V zadnjih letih je bilo odkritih mnogo pozitivnih lastnosti resveratrola, kot naprimer antioksidativne lastnosti, protirakavo in protivirusno delovanje, upočasnitev staranja... Raziskave kažejo, da resveratrol pomaga preprečevati poškodbe krvnih žil, preprečuje nastanek krvnih strdkov ter zmanjšuje raven holesterola v krvi (Wang in sod., 2010). Francoski paradoks pravi, da imajo francozi relativno nizko pojavnost bolezni srca in ožilja, kljub njihovi prehrani, bogati z nasičenimi maščobami. Že dolgo velja sum, da je to prav posledica uživanja rdečega vina z visoko vsebnostjo resveratrola (Wang in sod., 2010; White, 2009). Zaradi svojih pozitivnih lastnosti je resveratrol v zadnjih letih predmet mnogih raziskav, uporablja pa se tudi kot prehranski dodatek (Wang in sod., 2010). Tako iz znanstvenega kot iz ekonomskega vidika je torej izboljšanje in optimizacija njegove biosinteze zanimiv predmet za nadaljnje študije.

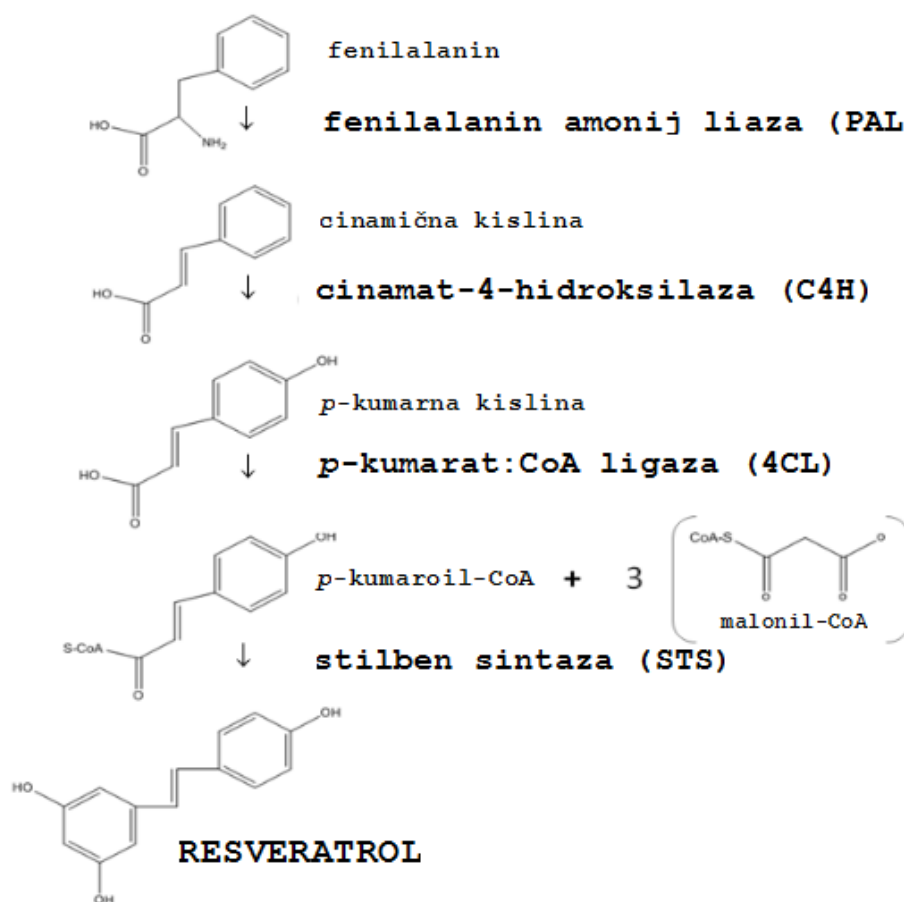
#### 2.4.1 Kemijska struktura in biosintetska pot

Resveratrol v rastlinah nastaja v več oblikah, prosti (aglikon) in glikozilirani (piceid), ter obstaja v *cis* in *trans* izomerih obeh oblik (Slika 11) (Wang in sod., 2010; White, 2009). V grozdju je resveratrol običajno v glikozilirani obliki, saj je to koristno za njegovo shranjevanje, transport in tudi preprečevanje razgradnje (White, 2009). Med pripravo vina piceidne izomere hidrolizirajo v *trans*-resveratrol, zato to obliko povezujejo z vsemi pozitivnimi učinki in je tako tudi najbolj preučena (White, 2009).



Slika 11: Kemijske strukture različnih oblik resveratrola (White, 2009).

Vse oblike resveratrola rastline sintetizirajo po fenil propanoidni poti, ki je prisotna v vseh višjih rastlinah in je odgovorna za nastanek širokega spektra fenolnih spojin, kot so naprimer flavonoidi, lignin in proantocianidini (Wang in sod., 2010). Prvi korak v sintezi resveratrola je deaminacija aminokislina fenilalanina z encimom fenilalanin amonij liaza (PAL). Pri tem nastane cinamična kislina, ki jo encim cinamat-4-hidroksilaza (C4H) pretvori v p-kumarno kislino. Encim p-kumarat:CoA ligaza (4CL) nato poveže p-kumarno kislino s pantotensko skupino koencima A in nastane p-kumaroil CoA. To je pomemben intermediat višjih rastlin, saj se lahko pretvori v monolignole za sintezo lignina, ali flavonoide za sintezo antocianina in proantocianina. V grozdju in drugih rastlinah, ki sintetizirajo resveratrol, pa ga encim stilben sintaza (STS) poveže s tremi molekulami malonil-CoA in tako nastane omenjeni produkt (Wang in sod., 2010).



Slika 12: Biosintetska pot resveratrola v rastlinah (White, 2009).

## 2.4.2 Genski in metabolni inženiring biosinteze resveratrola

V preteklih letih je bilo pokazano, da je sinteza resveratrola mogoča z gensko spremenjenimi mikroorganizmi (Beekwilder in sod., 2006; Horinouchi, 2009; Katsuyama in sod., 2007; Sydor in sod., 2010; Watts in sod., 2006). Največ raziskav opisuje sintezo resveratrola v kvasovkah *Sacharomyces cerevisiae* in v bakteriji *Escherichia coli* z rekombinantnima encimoma 4-kumarat:CoA ligaza in stilben sintaza (White, 2009). Rezultati kažejo variirajoče količine produciranega resveratrola, med 5 (Beekwilder in sod., 2006) in 400 mg/l (Sydor in sod., 2007), kar je lahko posledica mnogih dejavnikov, kot naprimer uporabe različnih gojišč ter različnih sevov gostiteljskih organizmov (Sydor in sod., 2010), različnih časov inkubacij, predvsem pa različnih virov uporabljenih genov za rekombinantne encime (White, 2009).

**Preglednica 2: Pregled dosedanjih poskusov rekombinantne sinteze resveratrola glede na izvor biosintetskih encimov 4CL in STS (White in sod., 2009).**

Izvor genov	Gostiteljski organizem	Koncentracija resveratrola [mg/l]
4CL - <i>Nicotiana tabacum</i> STS - <i>Vitis vinifera</i>	<i>Escherichia coli</i>	12 do 20
4CL - <i>Arabidopsis thaliana</i> STS - <i>Archis hypogaea</i>	<i>Escherichia coli</i>	105
4CL - <i>Lithospermum erythrorhizon</i> STS - <i>Archis hypogaea</i>	<i>Escherichia coli</i>	171
4CL - <i>Nicotiana tabacum</i> STS - <i>Vitis vinifera</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,8

Z uporabo še ostalih dveh encimov fenilpropanoidne poti do resveratrola (cinamat-4-hidroksilaze in fenilalanin amonij liaze) so bile sicer količine nastalega produkta manjše, manj kot 1 mg/l v *S.cerevisiae* (Trantas in sod., 2009) in okrog 40 mg/l v *E.coli* (Horinouchi, 2009), vendar so te raziskave pokazale, da v rekombinantnih mikroorganizmih delujejo encimi celotne fenilpropanoidne poti, kar je dobro izhodišče za nadaljnje eksperimente. Poleg tega so Zhang in sodelavci (2006) namesto cinamat-4-hidroksilaze in fenilalanin amonij liaze za sintezo resveratrola v sesalskih celicah uspešno uporabili tudi encim tirozin amonij liaza (TAL), ki pretvarja aminokislino tirozin neposredno v 4-kumarno kislino.

Eden od pristopov metabolnega inženiringa, približevanje encimov in tako usmerjanje intermediatov v točno določene encimske reakcije, je bil uporabljen tudi za poskus izboljšanja izkoristka biosinteze resveratrola (Zhang in sod., 2006). V *S. cerevisiae* so avtorji ob dodatku 4-kumarne kisline pokazali 15-krat večjo produkcijo resveratrola s fuzijo encimov 4-kumarat:CoA ligaze in stilben sintaze, povezanih s peptidnim povezovalcem iz treh aminokislin, kot v celicah s prostima encimoma.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema

**Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema, navedena po proizvajalcu**

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
BioMetra	naprava za opazovanje agaroznih gelov pod UV lučjo
BioRad	aparatura za agarozno gelsko elektroforezo
BioTek	bralec mikrotitrskih plošč Synergy MX
Brand	avtomatske pipete HandyStep, nastavki za avtomatsko pipeto
Canon	fotoaparatus za fotografiranje agaroznih gelov
Corbett	aparatura za verižno reakcijo s polimerazo
Dnr Bioimaging Systems	aparatura za fotografiranje agaroznih gelov
Eppendorf	termoblok Thermomixer R, namizna centrifuga, centrifuga 5415R, pipete Research Plus, nastavki za pipete, multikanalne pipete
Gilson	petrijevke
Golias	petrijevke
Gorenje	mikrovalovna pečica za segrevanje agaroznih gelov
Hanna instruments	magnetno mešalo
Hettich	centrifuga Universal 320R
Hewlett Packard	diodni spektrofotometer 8452A
Hofer	aparatura za agarozno gelsko elektroforezo
Horizon	kadička za agarozno gelsko elektroforezo
IKA	magnetna mešala, vrtinčnik MS3 basic
inoLab	pH meter WTW series
Kambič	inkubator
KERN	tehtnica 440-45N
LTH	hladilnik
Nalgene	stojala za mikrocentrifugirke
Sanyo	skrinja za -80°C
Sarstedt	nastavki za pipete
Sartorius	filtri s porami premera 0,2µm, tehtnica
Savart	vakuumski kondenzator SpeedVac
Schott Duran	erlenmajerice
Sutjeska	avtoklav
Thermo Finnigan	aparatura za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti
Thermo Scientific	spektrofotometer NanoDrop ND-1000
TPP	falkonke, mikrotitrne plošče
Zanussi	zamrzovalnik



### 3.1.2 Kemikalije

**Preglednica 4: Uporabljene kemikalije, navedene po proizvajalcu**

Proizvajalec	Kemikalije
Calbiochem	Kloramfenikol
Fermentas	Dream Taq™ Green PCR Mastermix, GeneJet™ Gel Extraction Kit, GeneJet™ PCR Purification Kit, GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, restriksijski encimi ( <i>Bam</i> HI, <i>Bbs</i> I, <i>Bsa</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hinc</i> II, <i>Not</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Spe</i> I, <i>Xba</i> I), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, restriksijski pufri, T4 ligaza, T4 ligazni pufur L-arabinoza, LB
Fluka	L-arabinoza, LB
Inalco	IPTG
Merck	agar-agar, CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, HCl, kloroform, kvasni ekstrakt, NaCl, natrijev dodecil sulfat
Sigma	agaroza, akrilamid, amonijev persulfat, ampicilin, β-merkaptotetanol, EDTA, etanol, etidijev bromid, etilacetat, kalijev acetat, kanamicin sulfat, KCl, metanol, MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O, MOPS, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , N,N'-metilenbisakrilamid, oligonukleotidni začetniki, ONPG, p-kumarna kislina, RbCl, sekundarna protitelesa, TEMED, <i>trans</i> -resveratrol, tripton, Tris (Trizma base), urea, glicerol
Thermo Scientific	SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate
Qiagen	Ni-NTA polnilo, primarna protitelesa

### 3.1.3 Rastopine in pufri

**Preglednica 5: Uporabljene rastopine in pufri ter njihova sestava**

Pufer	Sestava
50x TAE pufer za gelsko elektroforezo	242g Tris, 57,1ml ledocetne kisline, 100ml 0,5M EDTA, dH <sub>2</sub> O do 1l; pH 8,0
6x nanašalni pufer za gelsko elektroforezo	0,25% bromfenolmodro, 0,25%ksilencianol, 40% glukoza
TFB1	100mM RbCl, 25mM MnCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O, 30mM K-acetat, 10mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 15% glicerol; pH 5,8
TFB2	10mM RbCl, 10mM MOPS, 75mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 15%glicerol; pH 6,8
10% ločitveni poliakrilamidni gel	4,1ml MQ, 2,5ml 1,5M Tris/HCl pH 8,8, 100μl 10%SDS, 3,3ml 30% akrilamid, 50μl 10%APS, 5μl TEMED
4% vstopni poliakrilamidni gel	3,05ml MQ, 1,25ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8, 50μl 10% SDS, 665μl 30% akrilamid, 25μl 10%APS, 5μl TEMED
10x elektroforezni pufer za SDS z ureo	30g Tris, 10g SDS, 144g glicin, 48g urea, dH <sub>2</sub> O do 1l
4x nanašalni pufer za SDS z reducentom	0,138M SDS, 0,125M Tris/HCl pH 6,8, 40% (v/v) glicerol, 0,8 ml β-merkaptotetanol, 0,1% (v/v) bromfenol modro
Pufer za mokri prenos (Western prenos)	6,057g Tris, 28,8g glicin, 400 ml metanol, dH <sub>2</sub> O do 2l
Pufer za spiranje (Western prenos)	1xPBS (0,058M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,017M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,068M NaCl), 0,01% (v/v) Tween 20
Pufer za blokiranje (Western prenos)	50ml pufra za spiranje, 0,2% iBLOCK
Z-pufer	0,06M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,04M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01M KCl, 0,001M MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; pH 7,0
Z-pufer/SDS	Z-pufer, 1,6% (w/v) natrijev dodecil sulfat
Z-pufer/kloroform	Z-pufer, 1% (v/v) β-merkaptotetanol, (v/v)10% kloroform
Z-pufer/ONPG	Z-pufer, 0,4% (w/v) ONPG

### 3.1.3 Plazmidi

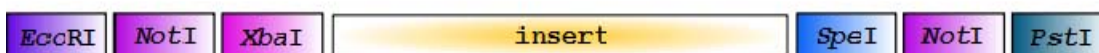
#### Preglednica 6: Uporabljeni plazmidni vektorji

Plazmid	Vir
pSB1A3	BioBrick®, Tom Knight laboratorij
pSB1K3	BioBrick®, Tom Knight laboratorij
pSB4C5	BioBrick®, Tom Knight laboratorij
pET28a	darilo (dr. Oliver Yu; Donald Danforth Plant Science Center)
pET19b	Novagen
pLysSRARE	Novagen

#### 3.1.4.1 BioBrick® plazmidni vektorji

Sistem BioKock (an. »BioBrick«) omogoča sestavljanje posameznih fragmentov z uporabo 5 standardnih restrikcijskih encimov (Shetty in sod. 2008). BioBrick vektorji v poliklonskem mestu vsebujejo (v sledečem zaporedju) 6 restrikcijskih mest: *EcoRI*, *NotI*, *XbaI*, *SpeI*, *NotI* in *PstI* (Slika a). Restrikcijska encima *XbaI* in *SpeI* tvorita štrleče konce, ki so si med seboj komplementarni in se lahko zlepijo. To omogoča vstavljanje insertov enega za drugim, pri tem pa med njimi nastane mešano mesto iz 6 nukleotidov (ACTAGA) (Slika b).

**A**



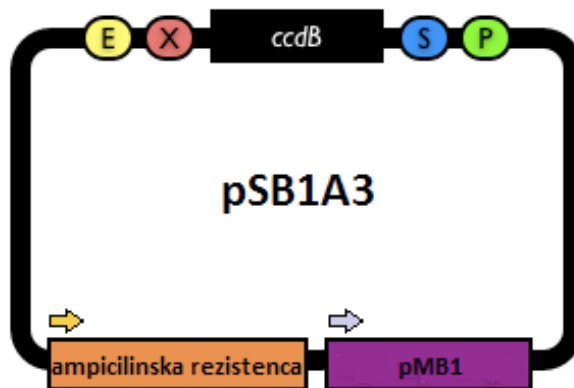
**B**



**Slika 13: Shematski prikaz sistema BioKock.** A) poliklonsko mesto BioBrick vektorja z vstavljenim insertom, B) združitev dveh fragmentov z nastankom mešanega mesta.

### 3.1.4.2 pSB1A3

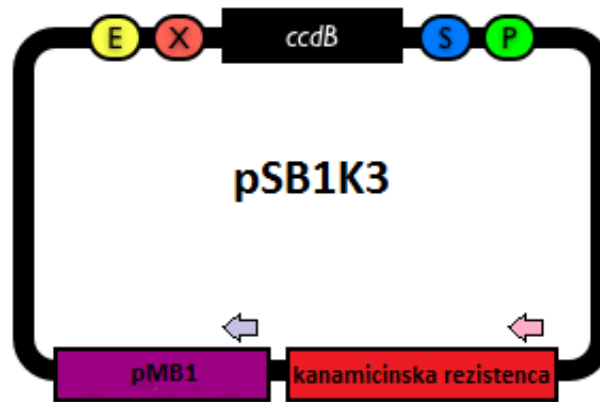
Vektor ima zapis za odpornost proti ampicilinu in pMB1 mesto začetka podvajanja, ki izvira iz pUC19. Ena celica vsebuje 100-300 kopij vektorja. Med BioBrick restriksijska mesta je vstavljen zapis za CcdB, letalen toksin, ki prepreči delovanje encima DNA giraze. Zapis za CcdB domeno predstavlja pozitiven selekcijski marker - bakterijske celice, ki vsebujejo plazmid s tem zapisom, ne preživijo. Pred vstavljanjem insertov v vektor smo tako gen *ccdB* izrezali z restriksijskima encimoma *EcoRI* in *PstI* ter željen konstrukt vstavili v prazen vektor. Vektor pSB1A3 smo uporabljali za pripravo konstruktov, ki smo jih nato prenesli v druge vektorje.



Slika 14: Shema plazmidnega vektorja pSB1A3

### 3.1.4.3 pSB1K3

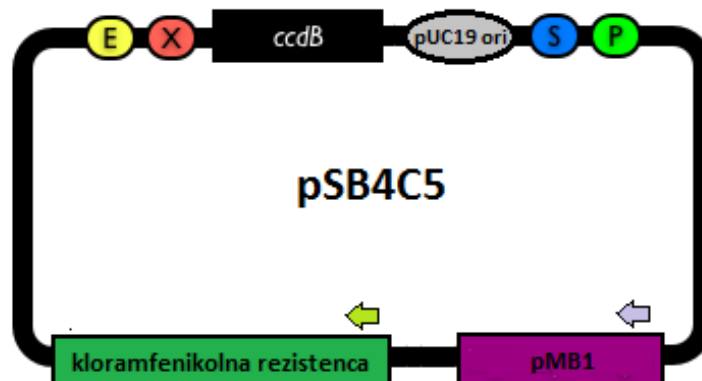
Vektor ima zapis za odpornost proti kanamicinu in pMB1 mesto začetka podvajanja, ki izvira iz pUC19. Ena celica vsebuje 100-300 kopij vektorja. Med BioBrick restriksijska mesta je enako kot pri vektorju pSB1A3 vstavljen zapis za CcdB. Pred vstavljanjem insertov v vektor smo gen *ccdB* izrezali z restriksijskima encimoma *EcoRI* in *PstI* ter željen konstrukt vstavili v prazen vektor. Vektor pSB1K3 smo uporabili za vstavitev programske DNA.



Slika 15: shema plazmidnega vektorja pSB1K3

#### 3.1.4.4 pSB4C5

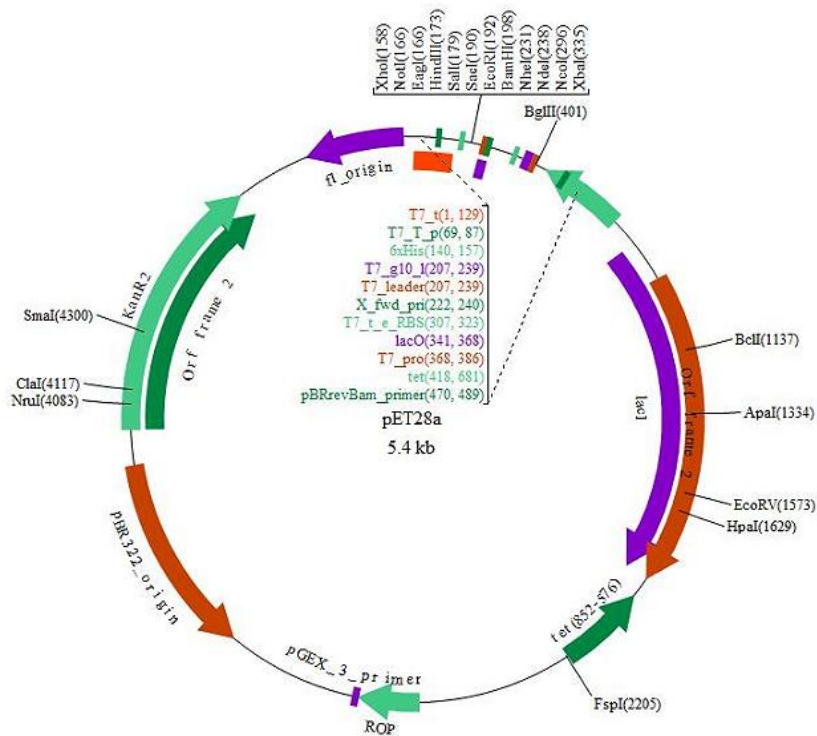
Vektor ima zapis za odpornost proti kloramfenikolu in mesto začetka podvajanja pSC101. Ena celica vsebuje okrog 5 kopij plazmida. Med BioBrick restrikcijska mesta je vstavljen zapis za CcdB domeno in mesto začetka podvajanja, ki izvira iz pUC19 – tako je vektor v večjem številu kopij, dokler vsebuje ta insert, kar olajša njegovo namnoževanje. Pred vstavljanjem insertov v vektor smo gen *ccdB* in mesto začetka podvajanja iz pUC19 izrezali z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *PstI* ter konstrukt vstavili v prazen vektor. V vektor pSB4C5 smo vstavili sistem za preverjanje učinkovitosti vezave DNA vezavnih proteinov.



Slika 16: Shema plazmidnega vektorja pSB4C5

### 3.1.4.5 pET28a

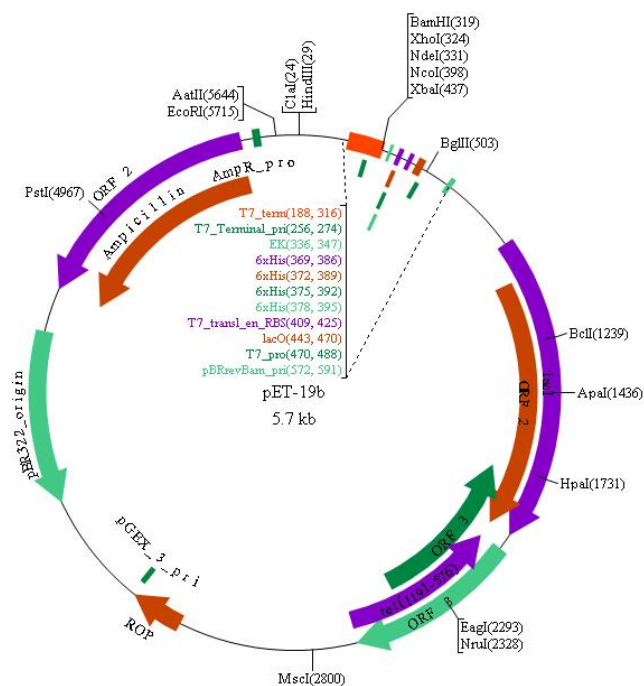
pET28a je vektor za izražanje proteinov v bakterijskih sistemih. Vsebuje zapis za T7 promotor, T7 terminator ter histidinski rep. Ima zapis za odpornost proti antibiotiku kanamicinu, kar omogoča selekcijo bakterij. Vektor pET19b smo uporabili za izražanje fuzije encimov 4CL in STS (Zhang in sod., 2006).



Slika 17: Plazmidna mapa vektorja pET28a (BVTech Plasmid, 2011b)

### 3.1.4.6 pET19b

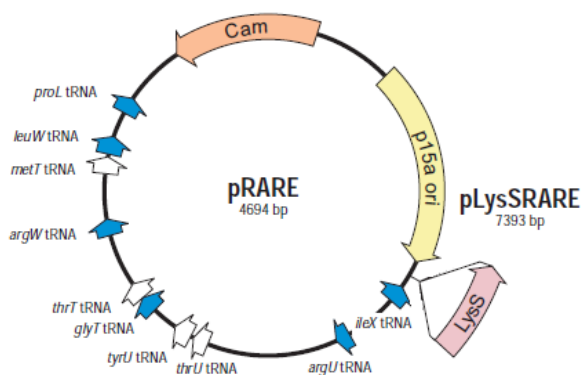
pET19b je vektor za izražanje proteinov v bakterijskih sistemih. Vsebuje zapis za T7 promotor, T7 terminator ter histidinski rep. Ima zapis za odpornost proti antibiotiku ampicilinu, kar omogoča selekcijo bakterij. Vektor pET19b smo uporabili za izražanje himernih biosintetskih encimov.



Slika 18: Plazmidna mapa vektorja pET19b (BVTech Plasmid, 2011a)

### 3.1.4.7 pLysSRARE

Plazmid pLysSRARE vsebuje gene za tRNA, ki prevajajo redke kodone v *E. coli*. Selekcijo bakterij omogoča zapis za odpornost proti antibiotiku kloramfenikolu. Plazmid pLysSRARE je bil že prisoten v sevu *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, v katerem smo izražali himerne biosintetske encime in fuzijo encimov 4CL in STS.



Slika 19: Shema plazmida pLysSRARE (Novy in sod., 2001)

### 3.1.4 Protitelesa

**Preglednica 7: Uporabljena protitelesa**

Protitelo	Opis
primarna protitelesa	mišja protitelesa, specifična za vezavo na 6 histidinskih ostankov
sekundarna protitelesa	kozja poliklonska protitelesa, specifična za vezavo na mišja IgG1, konjugirana s hrenovo peroksidazo

### 3.1.5 Oligonukleotidni začetniki

**Preglednica 8: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki**

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
Program 2bp F1	5'CTAGAGTTTGGATGGAGCGTGGGCGGGGTGTGGAAATTGATGCTG CATTGACCACCCAAGACGAGGATCCGTTTGGATG3'
Program 2bp F2	5'GAGCGTGGGCGGGGTGTGGAAATTGATGCTGCATTGACCACCCAA GACGAAGTAGTCTGCA 3'
Program 2bp R1	5'GACTAGTTCGTCTTGGGTGGTCAATGCAGCATCAATTTCCACACCC CGCCCACGCTCCATCCAAACGGATCCTCGTCTTGGGTGGTC3'
Program 2bp R2	AATGCAGCATCAATTTCCACACCCCGCCCACGCTCCATCCAAACT3'
Program 4bp F1	5'CTAGAGTTTGGATGTATCGCGTGGGCGGGTCCGTGTGGAAAGCGAG ATGCTGCACGGCGACCCCAAGACGAGGATCCGTTTGGATG3'
Program 4bp F2	5'TCGCGTGGGCGGGTCCGTGTGGAAAGCGAGATGCTGCACGGCGACC ACCCAAGACGAAGTAGTCTGCA3'
Program 4bp R1	5'GACTAGTTCGTCTTGGGTGGTCGCCGTGCAGCATCTCGCTTTCCAC ACGGACCGCCCACGCGATACATCCAAACGGATCCTCGTCTTGGGTGG TC3'
Program 4bp R2	5'GCCGTGCAGCATCTCGCTTTCCACACGGACCGCCCACGCGATACAT CCAAACT3'
Program 8bp F1	5'CTAGAGTTTGGATGTCCAGTACGCGTGGGCGTAACGCAGGTGTGGA AACATGAAGCGATGCTGCACGACACTCGACCACCCAAGACGAGGAT CCGTTTGGATG3'
Program 8bp F2	5'TCCAGTACGCGTGGGCGTAACGCAGGTGTGGAAACATGAAGCGATG CTGCACGACACTCGACCACCCAAGACGAAGTAGTCTGCA3'
Program 8bp R1	5'GACTAGTTCGTCTTGGGTGGTCGAGTGTGTCGTGCAGCATCGCTTCAT GTTTCCACACCTGCGTTACGCCCACGCGTACTGGACATCCAAACGGA TCCTCGTCTTGGGTGGTC3'
Program 8bp R2	5'GAGTGTGTCGTGCAGCATCGCTTCATGTTTCCACACCTGCGTTACGCC CACGCGTACTGCACATCCAAACT3'
PBSIIO_F	5'GACACGAAGTGTGGAAACAAT3'
PBSIIO_R	5'ATAAATTGTTCCACACTTCG3'
Zif268O_F	5'GACACGAAGCGTGGGCGCAAT3'
Zif268O_R	5'ATAAATTGCGCCCACGCTTCG3'
pSYN_TetO_F	5'CTAGATTGACACTCTATCAATGATAGAGTTATTTTACCACTAGTGC GGCCGCTGCA3'
pSYN_TetO_R	5'GCGGCCGCACTAGTGGTAAAATAACTCTATCATTGATAGAGTGTCA AT3'

### 3.1.6 Organizmi

**Preglednica 9: Uporabljeni bakterijski sevi bakterije *Escherichia coli***

Sev	Genotip	Vir
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> /supE44, $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1, relA1</i>	Zbirka sevov Kemijskega Inštituta
BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> $\lambda$ (DE3[ <i>lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5</i> ]), pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Zbirka sevov Kemijskega Inštituta
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Darilo (dr. Gregor Anderluh; Biotehniška fakulteta)

### 3.1.7 Gojišča

Bakterijske celice *E.coli* smo kultivirali na/v gojiščih LB (Luria-Bertani) ter 2YT (2x yeast triptone).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava gojišč

**Preglednica 10: Sestavine LB gojišč**

Kemikalije	Tekoče LB gojišče	Trdno LB gojišče
LB	25 g/l	25 g/l
Agar		15 g/l

**Preglednica 11: Sestavine 2YT gojišča**

Kemikalije	Tekoče 2YT gojišče
kvasni ekstrakt	10 g/l
Tripton	16 g/l
NaCl	5 g/l

V destilirani vodi smo raztopili sestavine gojišč (Preglednici 10 in 11) ter medij sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto. Tekoča gojišča smo hranili na sobni temperaturi do uporabe. Sterilni, delno ohlajeni mešanici za trdna gojišča smo dodali ustrezne antibiotike (kloramfenikol v končni koncentraciji 35 ng/ $\mu$ l, kanamicin v končni koncentraciji 50 ng/ $\mu$ l,



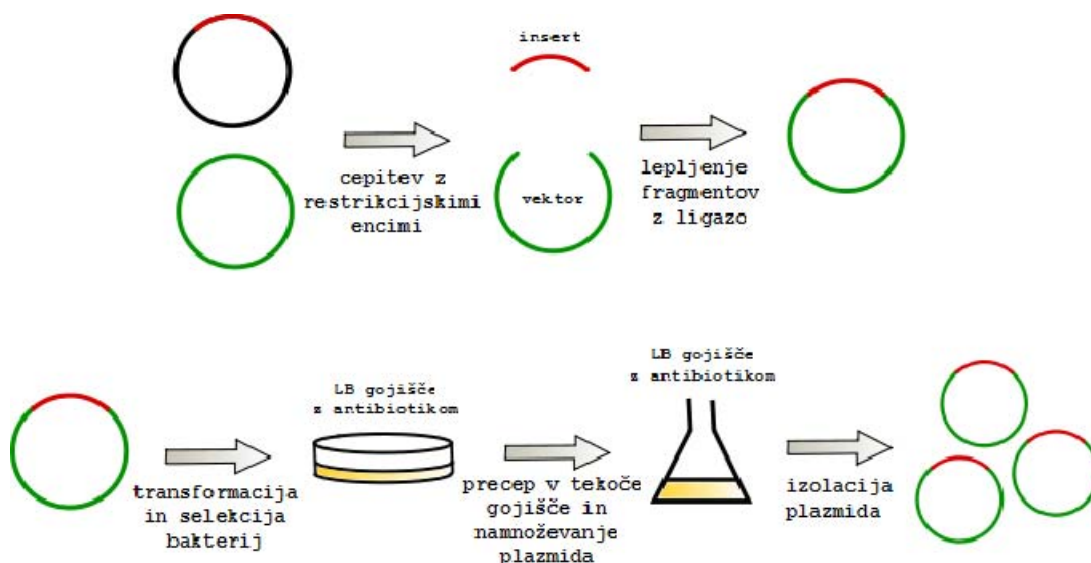
ampicilin v končni koncentraciji 75 ng/ $\mu$ l), gojišče rahlo premešali ter sterilno vlili v pripravljene Petrijeve plošče. Ko so se gojišča strdila, smo jih do uporabe shranili pri 4 °C.

### 3.2.2 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Material, potreben za gojenje bakterijskih kultur smo sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto (20 minut, 121 °C, 1 bar). Raztopine, občutljive na visoko temperaturo, smo sterilizirali s filtracijo skozi pore s premerom 0,22  $\mu$ m.

### 3.2.3 Osnovne metode molekularnega kloniranja

Večina metod s tega področja je opisana v priročnikih molekularne biologije (Ausubel in sod., 2002). V nadaljevanju so podrobno opisane le najpomembnejše.



Slika 20: Poenostavljena shema metod molekularnega kloniranja.

#### 3.2.3.1 Priprava kompetentnih celic

Iz trajne kulture smo celice *E.coli* nacepili na trdno LB gojišče ter jih inkubirali čez noč pri 37 °C. Posamezne kolonije smo naslednji dan precepili v 10 ml tekočega LB gojišča ter jih inkubirali čez noč pri 37 °C in stresanju 160 rpm. Zjutraj smo kulturo precepili v 100 ml

tekočega LB gojišča v takšnem volumnu, da je bil  $OD_{600nm}$  0,05. Kulturo smo inkubirali pri 37 °C in stresanju 160 rpm do  $OD_{600nm}$  0,5, nato smo jo ohladili na ledu za 5 minut, prenesli v sterilno centrifugirko in centrifugirali pri 4°C in 4000 rpm 5 minut. Odstranili smo supernatant ter celice resuspendirali v 30 ml predhodno ohlajenega TFB1 pufru. Suspenzijo smo inkubirali na ledu 90 minut in nato ponovno centrifugirali ter odstranili supernatant. Celice smo resuspendirali v 8 ml hladnega TFB2 pufru ter alikvot po 60 µl prenesli v pripravljene sterilne mikrocentrifugirke, zamrznili v tekočem dušiku ter shranili pri -80 °C.

### 3.2.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižne reakcije s polimerazo so bile izvedene z DNA polimerazo *Taq*. Vsebina reakcijskih mešanic ter temperaturni programi pomnoževanja so opisani v spodnjih preglednicah.

**Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo *Taq*.**

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen
matrična DNA	10 ng/µl	0,2 ng/µl	1 µl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	1 µl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	1 µl
DreamTaq™ Green PCR Master Mix			10 µl
MQ			7 µl

**Preglednica 13: Temperaturni program verižne reakcije s polimerazo *Taq*.**

Stopnja	Temperatura	Čas
1 začetna denaturacija	95 °C	5 min
2 30 ciklov	denaturacija	95 °C 1 min
	naleganje oligonukleotidnih začetnikov	$T_m$ 1 min
	podaljševanje	72 °C 1min/1kbp
3 končno podaljševanje	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov ( $T_m$ , ang. melting temperature) smo izračunali po spodnji formuli:

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

Op.: G, C, A in T pomenijo število določene dušikove baze v oligonukleotidem začetniku

### 3.2.3.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za analizo vzorcev DNA. Gostota gela je bila odvisna od dolžine pričakovanih fragmentov. Ustrezno količino agaroze smo zatehtali in jo s segrevanjem raztopili v 1x TAE puftru. Dodali smo 2  $\mu$ l etidijevega bromida (10 g/l) in gel vlili v kadičko. Po strditvi gela smo v žepke nanесли vzorce z nanašalnim pufrom ter DNA lestvico. Elektroforeza je potekala pri napetosti 100 V v 1x TAE puftru. Gel smo po končani elektroforezi osvetlili z UV lučjo in fotografirali.

### 3.2.3.4 Izolacija fragmentov DNA iz agaroznih gelov

Za izolacijo fragmentov DNA iz agaroznih gelov smo uporabili komercialno dostopen komplet GeneJet™ Gel Extraction Kit (Fermentas). Želeni fragment smo s skalpelom izrezali iz gela ter ga prenesli v mikrocentrifugirko. DNA smo izolirali po navodilih proizvajalca, postopek pa temelji na selektivni adsorbciji nukleinskih kislin na nosilec.

### 3.2.3.5 Restrikcija

**Preglednica 14: Uporabljene restrikcijske endonukleaze ter njihova prepoznavna mesta**

Encim	Prepoznavno mesto
<i>Bam</i> HI	5`G/GATCC3`
<i>Bbs</i> I	5`GAAGACNN/NNNN3`
<i>Bsa</i> I	5`GGTCTCN/NNNN3`
<i>Eco</i> RI	5`G/AATTC3`
<i>Hinc</i> II	5`GTY/RAC3`
<i>Nde</i> I	5`CA/TATG3`
<i>Not</i> I	5`GC/GGCCGC3`
<i>Pst</i> I	5`CTGCA/G3`
<i>Spe</i> I	5`A/CTAGT3`
<i>Xba</i> I	5`T/CTAGA3`

Plazmidno DNA smo cepili z restrikcijskimi endonukleazami, ki prepoznavajo točno določena zaporedja DNA. Reakcijska mešanica je vsebovala matrično DNA, 5  $\mu$ l 10x restrikcijskega pufra, 0,5  $\mu$ l restrikcijske endonukleaze (10 U/ $\mu$ l) na 1  $\mu$ g DNA ter MQ do

končnega volumna 50  $\mu$ l. Puffer smo izbrali glede na aktivnost uporabljenih encimov. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 4 ure pri 37 °C ter jo po preteklem času takoj nanесли na agarozni gel. Pri delu smo uporabljali encime, navedene v preglednici 14.

#### 3.2.3.6 Prileganje začetnih nukleotidov

Po 15  $\mu$ l vsakega začetnega oligonukleotida s koncentracijo 20 pM smo v aparaturi za verižno reakcijo s polimerazo inkubirali 5 minut pri 95°C ter nato postopno ohlajali do sobne temperature.

#### 3.2.3.7 Ligacija

Fragmente, pripravljene tako, da tvorijo lepljive konce, smo zlepili skupaj s pomočjo T4 ligaze, ki tvori fosfodiesterne vezi med dvema koncema DNA molekule. Za uspešno ligacijo je pomembno molarno razmerje med fragmentom in vektorjem, v katerega ga vstavljamo. Običajno je razmerje vektor:fragment 1:3, kar izračunamo po sledeči formuli (Enačba 2):

$$\text{masa(fragment)} = \text{masa(vektor)} \times \text{dolžina(fragment)} \times 3 / \text{dolžina(vektor)} \quad \dots(2)$$

Ligacijska mešanica je vsebovala 100 ng vektorja, izračunano količino fragmenta, 4  $\mu$ l 5x hitrega ligaznega pufra, 1  $\mu$ l T4 ligaze (400 U/ $\mu$ l) ter MQ do 20  $\mu$ l končnega volumna. Mešanico smo inkubirali na sobni temperaturi 20 minut, dodali 30  $\mu$ l sterilne MQ ter 25  $\mu$ l mešanice transformirali v kompetentne celice *E.coli*.

#### 3.2.3.8 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne bakterijske celice, shranjene na -80 °C, smo odtalili na ledu, jim dodali 25  $\mu$ l ligacijske mešanice oziroma izbrano količino plazmidne DNA ter jih inkubirali na ledu 30 minut. Nato je sledil toplotni šok na 42 °C 4 minute, 2 minuti inkubacije na ledu, dodatek 1 ml sterilnega tekočega LB gojišča ter inkubacija pri 37 °C in stresanju 500 rpm eno uro. Zatem smo celice centrifugirali pri 7000 rpm 3 minute ter odstranili supernatant. Zbrane

celice smo resuspendirali v 100  $\mu$ l tekočega LB gojišča ter jih razmazali na trdno LB gojišče z dodanim ustreznim antibiotikom. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37 °C.

### 3.2.3.9 Izolacija plazmidne DNA

Po prekonočni inkubaciji smo zrasle posamezne kolonije z zobotrebcem prenesli v 10 ml tekočega LB gojišča z dodanim ustreznim antibiotikom ter kulturo inkubirali okrog 12 ur pri 37 °C in stresanju 160 rpm. Plazmidno DNA smo iz tekoče kulture izolirali s komercialno dostopnim kompletom GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Ravnali smo po navodilih proizvajalca, postopek pa temelji na alkalni lizi celic ter vezavi plazmidne DNA na nosilec. Koncentracijo izolirane DNA smo določili spektrofotometrično z aparaturom NanoDrop z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm (raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 ng/ $\mu$ l dvoverižne DNA).

### 3.2.4 Merjenje beta-galaktozidazne aktivnosti

Bakterijske kulture z ustreznimi plazmidi smo inkubirali čez noč v 1 ml tekočega LB gojišča bodisi z dodano 1% arabinozo bodisi brez arabinoze pri 37 °C in stresanju 160 rpm. Po inkubaciji smo spektrofotometrično izmerili optične gostote kultur ( $A_{600nm}$ ). Nato smo 5  $\mu$ l vsake kulture prenesli v svojo luknjico na mikrotitrski plošči ter dodali 100  $\mu$ l Z-pufra s kloroformom in 50  $\mu$ l Z-pufra z SDS ter mikrotitrsko ploščo inkubirali 10 minut pri 28 °C. V vsako luknjico smo dodali 50  $\mu$ l 0,4 % raztopine ONPG v Z-puftru ter spektrofotometrično spremljali razlike v absorbanci pri 405 nm 20 minut v intervalih 30 sekund.

#### 3.2.4.1 Izračun podatkov za interpretacijo rezultatov

Iz dobljenih grafov smo razbrali maksimalno hitrost encimske aktivnosti ( $v_{max}$ ). Millerjeve enote  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti smo izračunali po naslednji formuli (Enačba 3):

$$\text{Millerjeve enote} = v_{max} \times 1000 / A_{600nm} \quad \dots(3)$$

### 3.2.5 Produkcija resveratrola

Bakterijske kulture smo inkubirali čez noč pri 37 °C in stresanju 160 rpm v 100 ml tekočega LB gojišča. Po prekonočni inkubaciji smo izmerili optične gostote kultur ( $A_{600nm}$ ) ter kulture precepili v 100ml tekočega 2YT gojišča v takšnih volumnih, da je bil  $OD_{600}$  0,2. Kulture smo inkubirali pri 37°C in stresanju 160 rpm do  $OD_{600}$  0,7 ter dodali 1 mM IPTG in 0,5 mM kumarno kislino. Nadaljnja inkubacija je potekala pri 30 °C in stresanju 160rpm, po določenih časovnih obdobjih (2, 6 in 24 ur) smo vzorčili po 10ml kulture, ter vzorcem izmerili optične gostote ( $A_{600nm}$ ) ter jih centrifugirali 5 minut pri 9000 rpm. Iz 1 ml supernatanta smo ekstrahirali resveratrol, preostanek pa zavrgli in celice shranili na -80 °C.

#### 3.2.5.1 Ekstrakcija resveratrola

Resveratrol smo ekstrahirali iz 1ml supernatanta bakterijske kulture. Dodali smo 50 µl 1 M HCl ter 800 µl etilacetata, ter mešanico vorteksirali 5 sekund. 500 µl zgornje faze smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, ter dodali novih 500 µl etilacetata. Mešanico smo ponovno vorteksirali 5 sekund, ter zopet prenesli 500 µl zgornje faze v mikrocentrifugirko. Etilacetat smo posušili v vakuumskem koncentradorju, ekstrakte resuspendirali v 350 µl 100% metanola ter jih analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

#### 3.2.5.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Ločevanje je potekalo pri 25 °C na koloni iz nerjavečega jekla. Ločitev smo dosegli v 35 minutah z gradientno elucijo in mobilno fazo iz acetatnega pufra (A) pH 5,6 ter acetonitrila (B). Program gradientne elucije pri pretoku 1,5 ml/min: 5 min 95% A, 15 min 95-50 % A, 3 min 50-5 % A, 5 min 5 % A, 5 min 95 % A. Kromatograme smo spremljali pri valovni dolžini 303 nm. Kot standard smo uporabili 99 % *trans*-resveratrol v 50 % metanolu (v/v).

### 3.2.3 Dokazovanje izražanja encimov

#### 3.2.3.1 Liza celic in soniciranje

100ml bakterijske kulture smo centrifugirali ter odstranili supernatant. Zbranim celicam smo dodali 2 ml liznega pufru ter 2  $\mu$ l mešanice proteaznih inhibitorjev (CPI) in inkubirali na ledu 30 minut. Lizat smo odpipetirali v stekleno čašo in celice sonicirali. Soniciranje je potekalo pri nastavitvah pulza 1 s ON, 2 s OFF, čas 3 minute, amplituda 40 %. Po soniciranju smo vzorce obdelali z encimom benzonazo (5 minut na 37 °C).

#### 3.2.3.2 Vezava na Ni-NTA polnilo in priprava vzorcev za poliakrilamidno elektroforezo

200  $\mu$ l Ni-NTA polnila smo prenesli v mikrocentrifugirke ter centrifugirali 5 minut pri 1000 obratih. Po centrifugiranju smo s pipeto odstranili odvečni 20 % etanol, v katerem je bilo polnilo shranjeno. Dodali smo 100  $\mu$ l 8 M uree v Trisu (pH 8,0) ter mikrocentrifugirke rahlo premešali in ponovili centrifugiranje. Ureo smo odstranili s pipeto ter dodali 1ml soniciranih celic, obdelanih z benzonazo, in jih stresali 2 uri pri temperaturi 4 °C in 250 obratih na minuto. Vzorce smo zopet centrifugirali 5 minut pri 1000 rpm ter odstranili supernatant in vezane proteine eluirali z 100  $\mu$ l 100 mM EDTA z dodano 8 M ureo. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke, dodali 25  $\mu$ l 4x nanašalnega SDS pufru z reducentom ter 0,48 g uree, vzorce centrifugirali ter jih 10 minut segrevali pri 95 °C.

#### 3.2.3.3 Priprava gelov in poliakrilamidna gelska elektroforeza

Poliakrilamidne gele smo pripravili tako, da smo med dve stekelci z razmikom 1,5 mm najprej vlili 10 % (v/v) ločitveni gel. Sestavine smo zamešali v čaši in s pipeto s tekočo mešanico napolnili prostor med stekelcema, vpetima v stojalo, ter jo prelili s 100  $\mu$ L izopropanola, da se je poravnala gladina med tekočima fazama ter da smo preprečili dostop kisika iz zraka, ki bi lahko motil polimerizacijo ločitvenega gela. Po 45 minutah smo izopropanol odstranili ter na ločitveni gel vlili vstopni gel, zamešali v čaši ter vanj vstavili glavniček za oblikovanje žepkov. Vstopni gel smo pustili polimerizirati 30 minut.

Uporabili smo ga takoj ali pa ga shranili pri 4 °C, tako da smo pred tem žepke napolnili z vodo MQ, gel ovili v omočeno papirnato brisačo in še v alu folijo.

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo izvajali s sistemom Mini-Protean II, tako kot je navedeno v navodilih proizvajalca. Sestavili smo aparaturo za SDS-PAGE in v žepke nanesli pripravljene vzorce in velikostni standard PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder. Elektroforeza je potekala približno 40 minut pri stalni napetosti 200 V v puftru z 8 M ureo. Med potekom elektroforeze je vidno pomikanje barvila bromfenol-modrega, ki je sestavni dela nanašalnega pufra. Ko je to pripotovalo do spodnjega roba ločitvenega gela, smo elektroforezo ustavili..

### 3.2.3.3 Western prenos

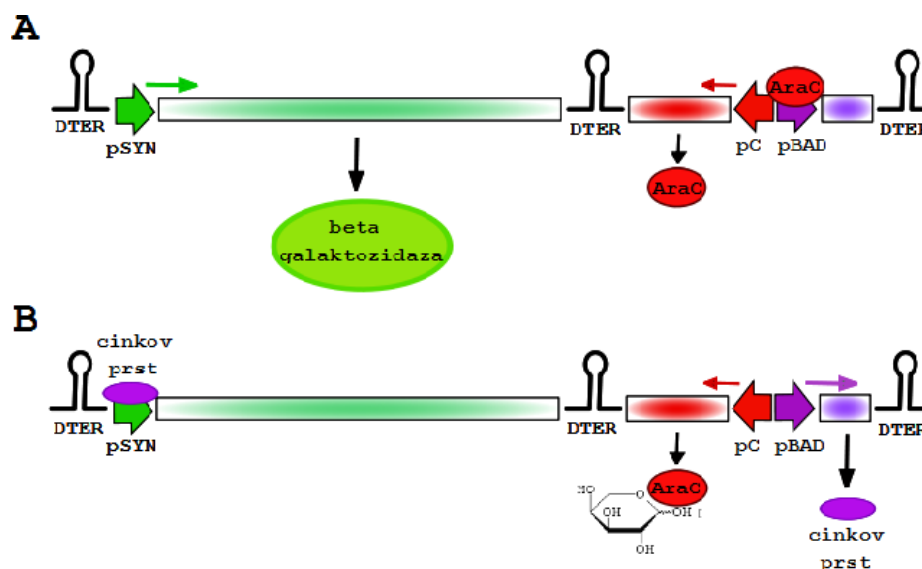
Po končani elektroforezi smo na kaseto po vrsti zložili blazinico, filtrirni papir, poliakrilamidni gel, membrano, ponovno filtrirni papir in blazinico. Kaseto smo vstavili v plastično posodo, napolnjeno z na 4 °C ohlajenim pufrom za Western-prenos. V pufer smo namestili še hladilno enoto, ki je preprečevala, da bi se pufer zaradi toka elektrike pregreval. Prenos je potekal 90 minut pri stalnem toku 350 mA ob rahlem mešanju z magnetnim mešalom na električnem mešalu. Po končanem prenosu smo membrano sprali z destilirano vodo in jo 60 minut ali preko noči pri 4 °C blokiral s pufrom za blokiranje. Membrano smo trikrat sprali z 1-kratnim pufrom PBS. Po spiranju smo membrano zavarjeno v vrečki PVC ob rahlem stresanju inkubirali 90 min v raztopini s primarnimi protitelesi. Sledilo je trikratno spiranje po 5 minut s pufrom PBS in inkubacija 40 minut s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Za detekcijo hrenove peroksidaze smo uporabili reagent Femto (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate). 1,5 mL pripravljenega reagenta smo nakapljali na stekleno ploščo, nanjo pa položili membrano, tako da je bila stran z vezanimi proteini potopljena v reagent. Inkubacija je potekala 5 minut pri sobni temperaturi. Membrano smo nato vstavili med dve trši plastični foliji in jo posneli v napravi za slikanje membran tako v beli svetlobi kakor v temi. Posnetka smo s pripadajočim računalniškim programom prekrili in ustrezno obdelali.



## 4 REZULTATI

### 4.1 PREVERJANJE UČINKOVITOSTI VEZAVE CINKOVIH PRSTOV

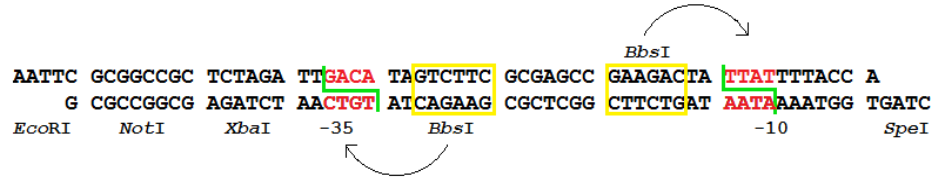
Po izbiri primernih DNA vezavnih domen za namene te diplomske naloge, smo želeli preveriti, če se te v bakterijskem sistemu zares vežejo na svoja prepoznavna zaporedja. Za preverjanje učinkovitosti vezave cinkovih prstov smo pripravili poseben sistem, ki omogoča detekcijo vezave preko vpliva na transkripcijo reporterskega gena za encim  $\beta$ -galaktozidazo.



**Slika 21: Sistem za preverjanje učinkovitosti vezave cinkovih prstov na vezavno zaporedje.** A) V odsotnosti arabinoze je p<sub>BAD</sub> promotor inhibiran z represorjem AraC in cinkov prst ne nastaja, promotor p<sub>SYN</sub> pa je prost za vezavo RNA polimeraze in gen za  $\beta$ -galaktozidazo se prepiše. B) Ob prisotnosti arabinoze je ekspresija gena za cinkov prst pod promotorjem p<sub>BAD</sub> aktivirana. Nastali protein se veže na svoje vezavno mesto v promotorju p<sub>SYN</sub>, in tako je preprečen dostop RNA polimerazi, posledično pa  $\beta$ -galaktozidaza ne nastaja.

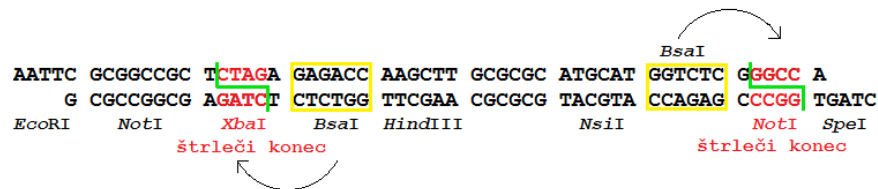
Sistem za preverjanje učinkovitosti vezave cinkovih prstov smo pripravili v dveh delih, na ločenih plazmidih. Prvi del je sestavljen iz dvojnega terminatorja (Dter) ter sintetičnega promotorja p<sub>SYN</sub>. Promotor p<sub>SYN</sub> med mestoma -35 in -10 vsebuje prepoznavni mesti za restriktijski encim *Bbs*I, ki cepi molekulo DNA na mestu oddaljenem 6 nukleotidov od

svojega prepoznavnega zaporedja, kar omogoča izrez dela promotorja ter vstavitev vezavnih zaporedij (operatorjev) za cinkove prste s primernimi štrlečimi konci (Slika 22).



**Slika 22: Prileganje oligonukleotidnih začetnikov za sestavitev sintetičnega promotorja  $p_{\text{SYN}}$  z mestom za vstavitev vezavnih zaporedij.** Z rumeno sta označeni prepoznavni mesti restrikcijskega encima *BbsI*, puščice pa kažejo na mesto cepitve DNA. Z zeleno je označen način cepitve molekule DNA, z rdečo pa štrleči konci, ki nastanejo ob cepitvi.

Drugi del sistema vsebuje reporterski gen *lacZ*, ki kodira encim  $\beta$ -galaktozidazo, za njim pa dvojni terminator. Za *lacZ* genom je inducibilni arabinozni promotor  $p_{\text{BAD}}$  z genom za svoj represor AraC in mestom za vkloniranje cinkovih prstov (Slika 23), ter dvojni terminator. Mesto za vkloniranje cinkovih prstov vsebuje prepoznavni mesti za restrikcijski encim *BsaI*, ki molekulo DNA cepi na mestu oddaljenem 5 nukleotidov od prepoznavnega mesta, kar omogoča izrez dela zaporedja in vstavitev gena za cinkov prst, rezanega z encimoma *XbaI* na 5' koncu in *NotI* na 3' koncu.



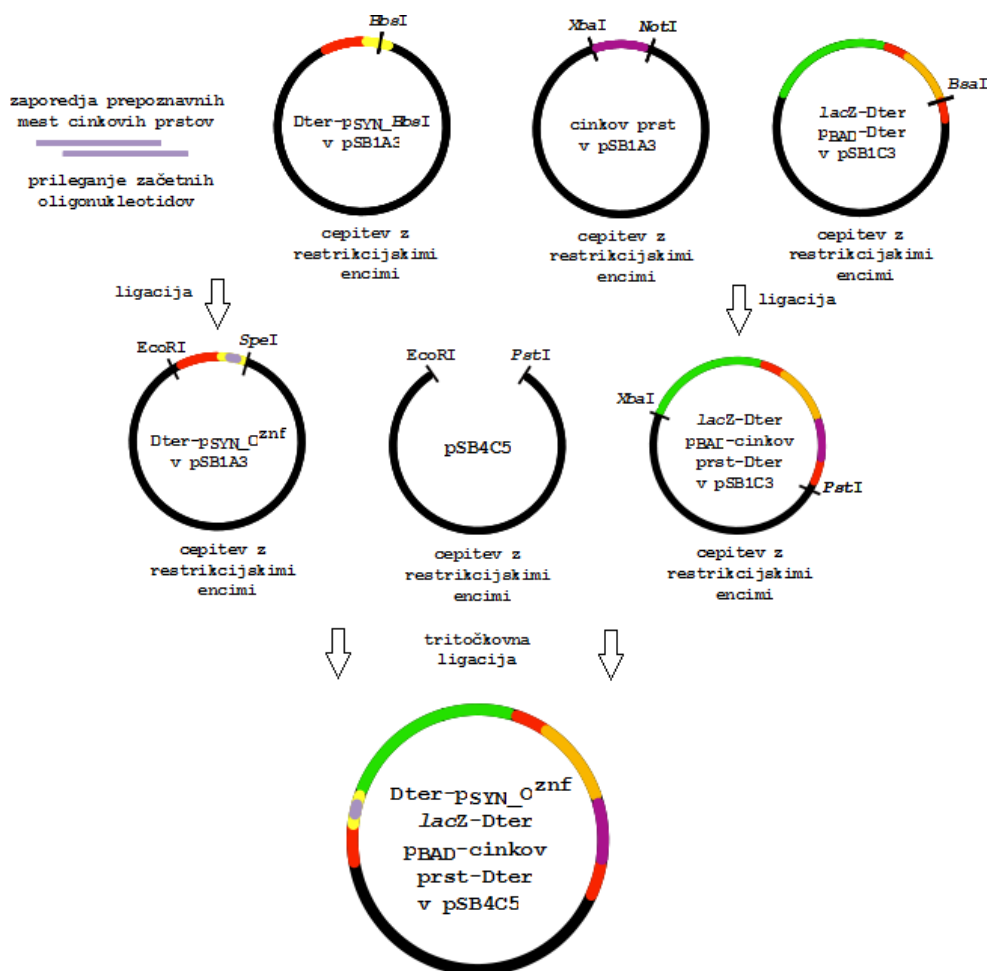
**Slika 23: Prileganje oligonukleotidnih začetnikov za sestavitev mesta za vkloniranje cinkovih prstov.** Z rumeno sta označeni prepoznavni mesti restrikcijskega encima *BsaI*, puščice pa kažejo na mesto cepitve DNA. Z zeleno je označen način cepitve molekule DNA, z rdečo pa štrleči konci, ki nastanejo ob cepitvi.

Oba dela sistema je mogoče po vstavitvi željenih vezavnih zaporedij ter genov za cinkove prste združiti na enem plazmidu tako, da je gen za  $\beta$ -galaktozidazo pod regulacijo promotorja  $p_{\text{SYN}}$  (Slika 21). Ob vezavi cinkovega prsta na vezavno zaporedje v promotorju  $p_{\text{SYN}}$  se gen *lacZ* ne prepíše (Slika 21b), saj je RNA polimerazi preprečen dostop do promotorja, če je vezavno mesto prosto, pa nastaja encim  $\beta$ -galaktozidaza (Slika 21a). Vstavljen gen za cinkov prst je pod nadzorom promotorja  $p_{\text{BAD}}$ , pred katerim je tudi zapis

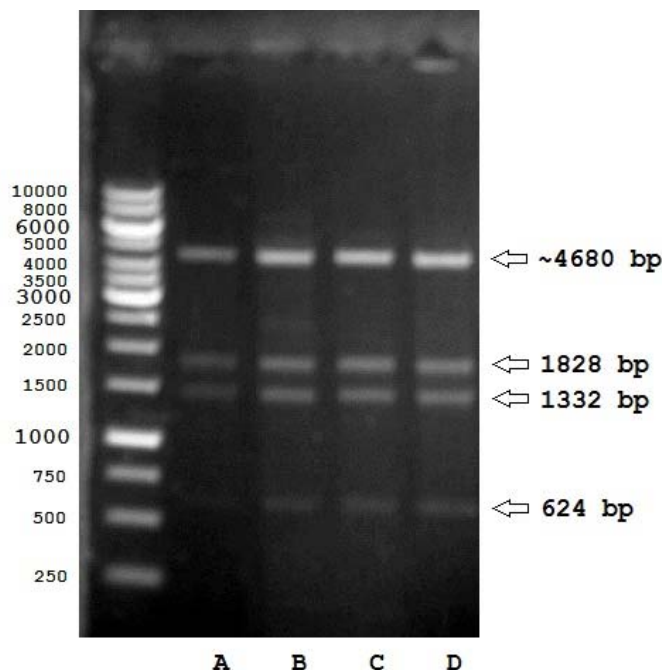
za njegov regulator AraC. Slednji v prisotnosti arabinoze stimulira ekspresijo genov pod  $p_{BAD}$  promotorjem, v njeni odsotnosti pa jo inhibira.

#### 4.1.1 Priprava DNA konstruktov

Konstrukta, uporabljena pri pripravi sistema za preverjanje učinkovitosti vezave cinkovih prstov, sta bila pripravljena med projektom iGEM 2010, pri kloniranju pa je sodelovalo več članov ekipe. Shema kloniranja končnih konstruktov je prikazana na sliki 24. Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 25) in sekvenciranjem (Priloga A).



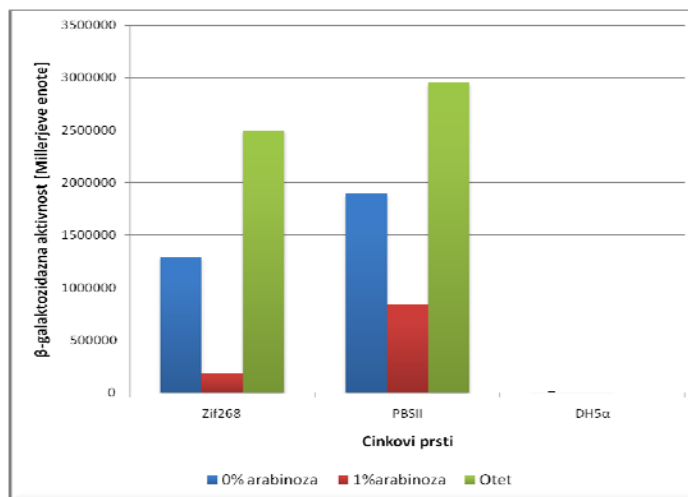
Slika 24: Shematski prikaz postopka priprave končnih konstruktov za preverjanje vezave cinkovih prstov.



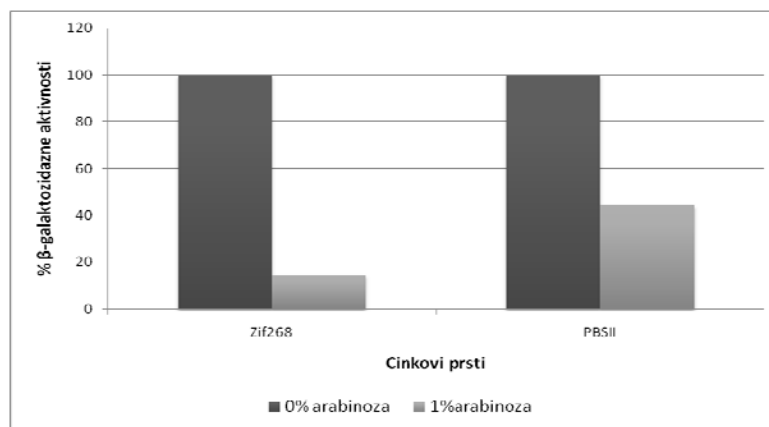
**Slika 25: Kontrolne restrikcije končnih DNA konstruktov za preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov.** Na 0,8% agarozni gel smo nanegli restrikcijske mešanice konstruktov, rezanih z encimoma *Bam*HI in *Hinc*II, ter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder lestvico. Pričakovane velikosti fragmentov so bile 624 bp, 1332 bp, 1828 bp in 4674 bp za PBSII ter 4680 bp za Zif268. Na progi A je rezan konstrukt Dter- $p_{SYN\_O}^{Zif268}$ -*lacZ*-Dter- $p_{BAD}$ -Zif268-Dter, na progi B Dter- $p_{SYN\_O}^{Tet}$ -*lacZ*-Dter- $p_{BAD}$ -Zif268-Dter, na progi C Dter- $p_{SYN\_O}^{PBSII}$ -*lacZ*-Dter- $p_{BAD}$ -PBSII-Dter in na progi D Dter- $p_{SYN\_O}^{Tet}$ -*lacZ*-Dter- $p_{BAD}$ -PBSII-Dter. Iz slike je razvidno, da dobljeni fragmenti po velikosti ustrezajo pričakovanim.

#### 4.1.2 Učinkovitost in specifičnost vezave izbranih cinkovih prstov

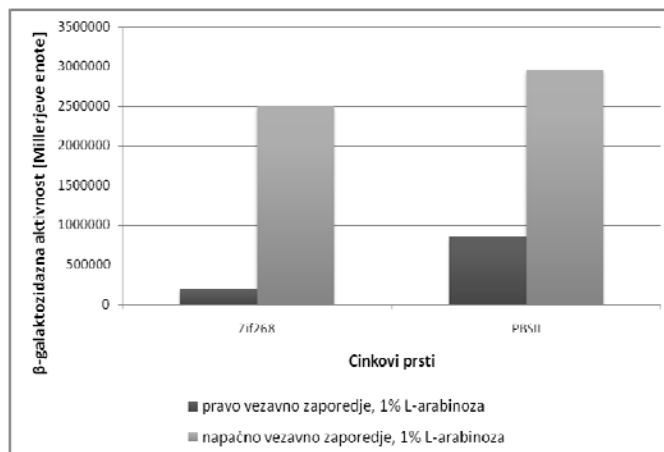
Učinkovitost vezave cinkovih prstov smo preverjali z beta-galaktozidaznim testom, postopkom, ki je podrobneje opisan v poglavju Materiali in metode. Testirali smo vezavo cinkovih prstov Zif268 in PBSII, zanimala pa nas je predvsem razlika v  $\beta$ -galaktozidazni aktivnosti celic, inkubiranih v odsotnosti oziroma prisotnosti L-arabinoze. Ker nas je zanimalo tudi, ali je znižanje  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti res posledica specifične vezave testiranega proteina na domnevno tarčno zaporedje, smo namesto pravega vezavnega mesta v promotor  $p_{SYN}$  vstavili tudi vezavno mesto za Tet represor (represor tetraciklinskega operona)  $O^{Tet}$ , na katerega naj se izbrani cinkovi prsti ne bi vezali. Podatki meritev in izračuni Millerjevih enot so na voljo v prilogi E.



**Slika 26: Represija  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti s cinkovima prstoma Zif268 in PBSII.** Bakterijske kulture *E.coli* seva DH5 $\alpha$  s transformiranimi DNA konstrukti smo inkubirali v prisotnosti 0% ali 1% L-arabinoze. Celice smo lizirali in spektrofotometrično merili spremembo barve ob razgradnji o-nitrofenilgalaktozida (ONPG), substrata za encim  $\beta$ -galaktozidazo. Modri stolpci predstavljajo celice s konstrukti cinkovih prstov v kombinaciji s pravima vezavnima mestoma, neinducirane z arabinozo, rdeči stolpci pa inducirane. Zeleni stolpci predstavljajo konstrukta cinkovih prstov v kombinaciji z vezavnim mestom za Tet represor. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice *E.coli* seva DH5 $\alpha$ , ki ne izražajo gena za encim  $\beta$ -galaktozidazo. Iz slike je jasno razvidna specifična vezava cinkovega prsta na svoje tarčno zaporedje, saj je  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost bistveno povečala pri dodani 1% L-arabinozi, kot pri kontrolah brez L-arabinoze in z napačnim vezavnim mestom.



**Slika 27: Učinkovitost delovanja cinkovih prstov kot umetnih represorjev transkripcije.** Predpostavili smo, da je  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost v odsotnosti arabinoze maksimalna, saj naj se cinkov prst ne bi sintetiziral. Graf prikazuje zmanjšanje  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti (v odstotkih) ob vezavi cinkovega prsta na promotor  $p_{SYN}$ . Iz slike je jasno razvidno močno zmanjšanje aktivnosti v prisotnosti cinkovih prstov, kar dokazuje njuno učinkovito vezavo.



**Slika 28: Specifičnost vezave cinkovih prstov.** Graf prikazuje primerjavo  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti v prisotnosti 1% L-arabinoze za konstrukte cinkovih prstov v kombinaciji s pravim vezavnim zaporedjem ter z napačnim vezavnim zaporedjem. Iz slike je jasno razvidno močno znižanje aktivnosti ob vezavi na pravo vezavno zaporedje, kar dokazuje specifično vezavo cinkovih prstov.

#### 4.2 SINTEZA RESVERATROLA Z VEZAVO ENCIMOV NA MOLEKULO DNA

Za sintezo resveratrola smo uporabili dva himerna encima, sestavljena iz DNA vezavne domene za vezavo na programsko DNA, ter encimske domene za sintezo želene spojine. Encim 4-kumarat:CoA ligaza, ki izvira iz navadnjega repnjakovca, je povezan s cinkovim prstom Zif268 (Zif268:4CL), encim stilben sintaza iz vinske trte pa s cinkovim prstom PBSII (PBSII:STS). Cinkovi prsti so z encimi povezani s peptidnim povezovalcem iz 10 aminokislin ([Gly]<sub>2</sub>Ser[Gly]<sub>3</sub>Ser[Gly]<sub>2</sub>Ser). Gena za oba himerna encima sta vstavljena v vektor pET19b med T7 promotor in T7 terminator.

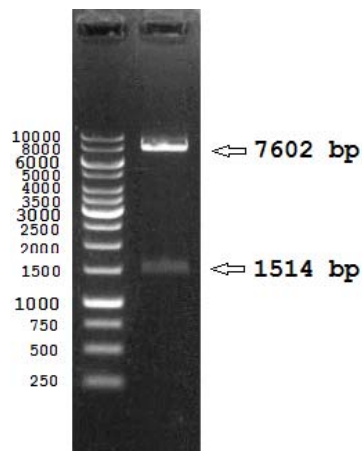
Programska DNA je umetno sintetizirano zaporedje nukleotidov, vstavljeno v plazmidni vektor pSB1K3. Nukleotidno zaporedje vsebuje vezavna mesta za DNA vezavne proteine, v našem primeru himerne encime za sintezo resveratrola. Ob vezavi DNA vezavnih domen himernih encimov so tudi encimske domene fiksirane na kratki razdalji v točno določenem vrstnem redu (Slika 30). Zaradi njihove bližine naj bi reakcije pretvorbe intermediatov potekale hitreje, saj ni potrebno njihovo potovanje po citoplazmi do ostalih encimov, ki so v običajnih razmerah naključno razporejeni v celici. Poleg tega bližina prepreči tudi razpad morebitnih nestabilnih intermediatov oziroma njihova dostopnost drugim encimom v celici, kar naj bi še povečalo izkoristek biosinteze.



Slika 29: Na programsko DNA vezana himerna encima za sintezo resveratrola.

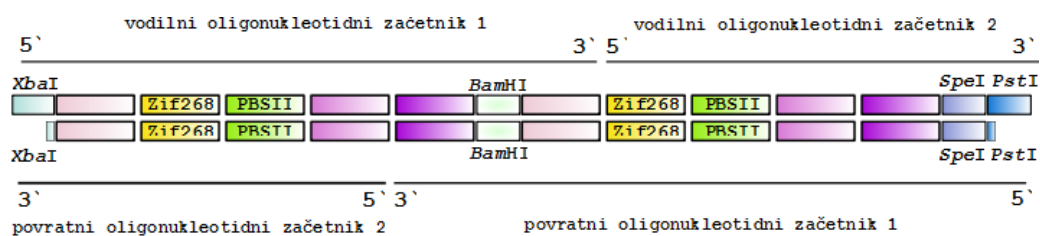
#### 4.2.1 Priprava DNA konstruktov

DNA konstrukti himernih biosintetskih encimov ter programske DNA so bili pripravljani v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, pri pripravi konstruktov pa je sodelovalo več oseb. Himerna encima Zif268:4CL in PBSII:STS smo pripravili z metodami molekularnega kloniranja in vstavljena v ekspresijski vektor pET19b med T7 promotor in T7 terminator, fuzijo encimov 4CL:STS v ekspresijskem vektorju pET28a pa nam je velikodušno podaril dr. Oliver Yu (Donald Danforth Plant Science Centre). Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 31) in sekvenciranjem (Priloga C).

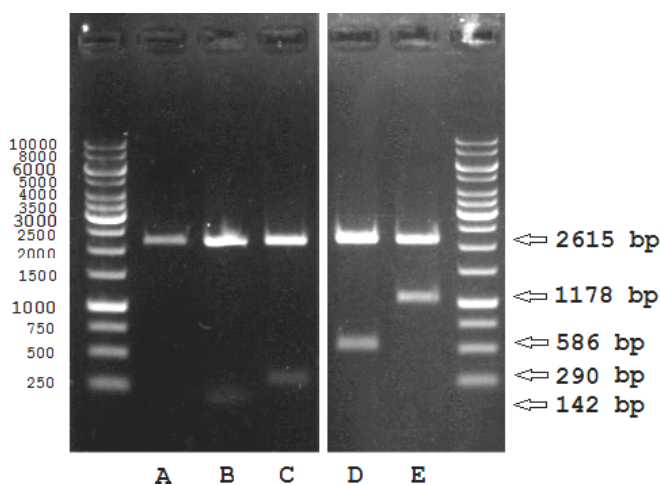


Slika 30: Kontrolna restrikcija DNA konstrukta Zif268:4CL PBSII:STS v ekspresijskem vektorju pET19b. Na 0,8% agarozni gel smo nanegli restrikcijsko mešanico konstrukta, cepljenega z restrikcijskima encimoma *NdeI* in *SpeI*, ter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder lestvico. Pričakovane velikosti fragmentov so bile 7602 in 1514 bp. Iz slike je jasno razvidno, da dobljeni fragmenti po dolžini ustrezajo pričakovanim.

Programske DNA (Priloga D) smo pripravili s prileganjem štirih začetnih oligonukleotidov (Slika 32). Po vstavitvi dobljenih nukleotidnih zaporedij v vektor pSB1K3 smo jih klonirali po BioBrick standardu ter tako sestavili več kopij programske DNA v istem plazmidnem vektorju. Ustreznost nukleotidnih zaporedij smo preverili s kontrolno restrikcijo (Slika 33) in sekvenciranjem (Priloga D). Programske DNA poleg vezavnih mest za cinkova prsta, uporabljena pri tej diplomski nalogi, vsebujejo še vezavna mesta za druge cinkove prste, saj smo nameravali isto molekulo uporabiti v nadaljnjih eksperimentih z večjim številom biosintetskih encimov.



**Slika 31: Shematski prikaz prileganja začetnih oligonukleotidov programskih DNA.** Začetni oligonukleotidi so bili načrtovani tako, da so po prileganju nastali *XbaI* in *PstI* štrleči konci za ligacijo v primerno rezan BioBrick plazmidni vektor.

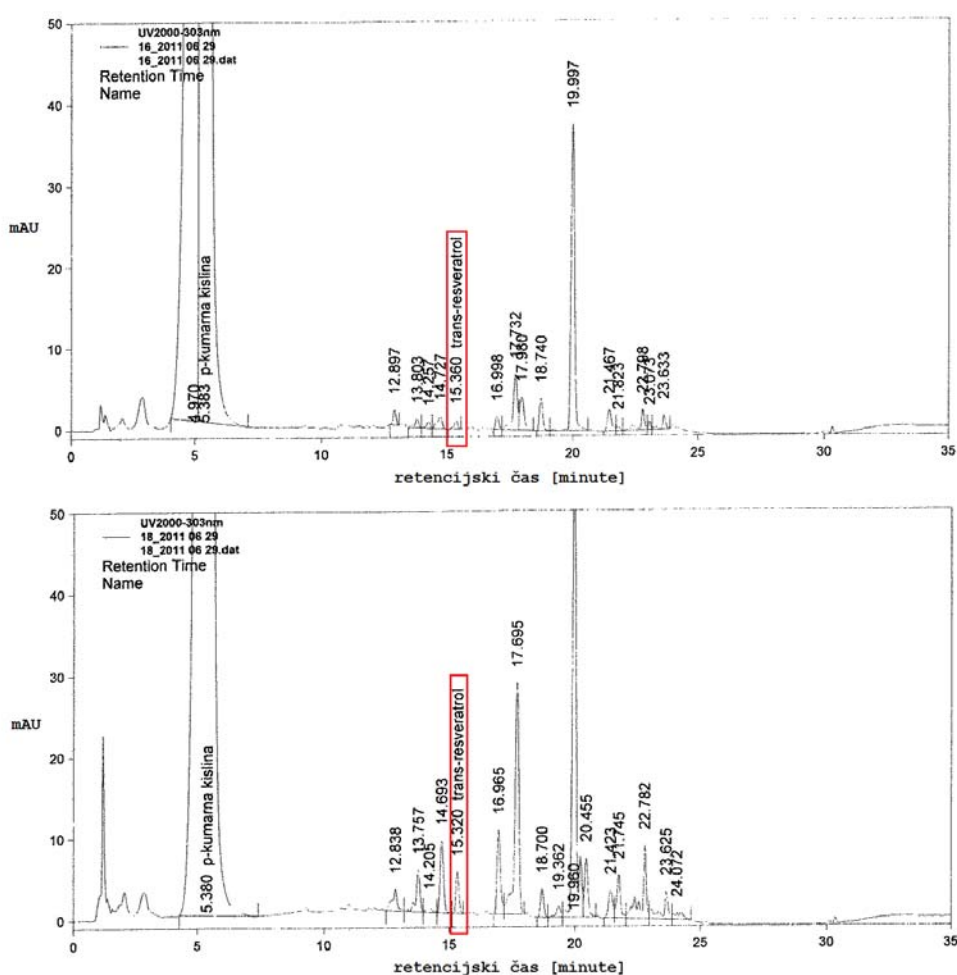


**Slika 32: Kontrolne restrikcije DNA konstruktov programskih DNA.** Na 0,8% agarozni gel smo nanegli restrikcijske mešanice plazmidov, cepljenih z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *PstI*, ter GeneRuler™ 1kb DNA Ladder lestvico. Na progi A je prazen pSB1K3 vektor dolžine 2615 bp, na progi B 2 kopiji programske DNA z 2 nt vmesnikom (dolžina 142 bp), na progi C 4 kopije programske DNA z 2 nt vmesnikom (dolžina 290 bp) na progi D 8 kopij programske DNA z 2 nt vmesnikom (dolžina 586 bp) in na progi E 16 kopij programske DNA z 2 nt vmesnikom (dolžina 1178 bp). Iz slike je jasno razvidno, da dobljeni fragmenti po dolžini ustrezajo pričakovanim.



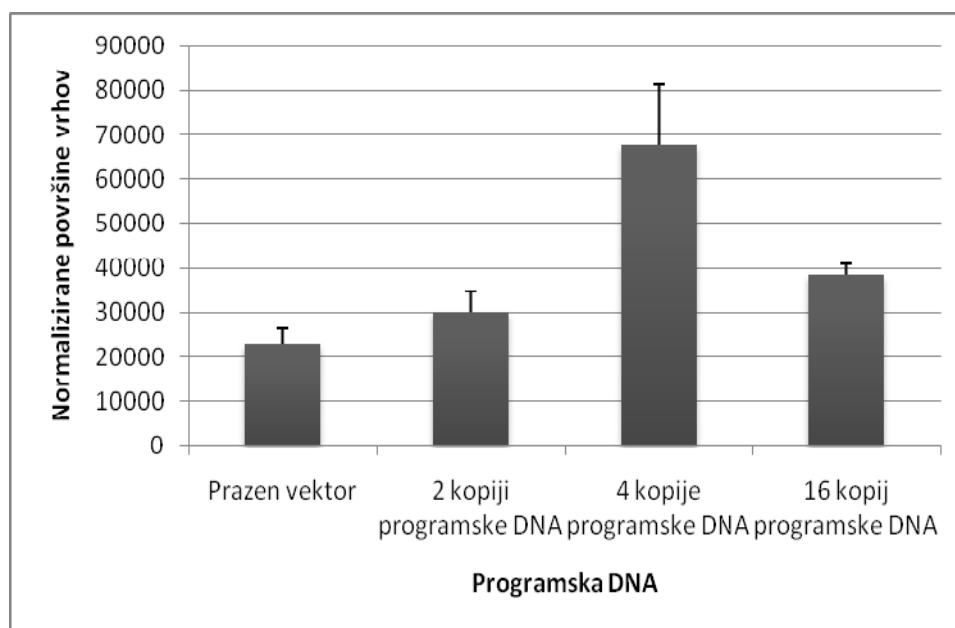
## 4.2.2 Sinteza resveratrola

V začetku smo nameravali encime za biosintezo resveratrola izražati v sevu *E.coli* BL21 (DE3)pLysS. Izkazalo se je, da v tem sevu nastane zelo malo resveratrola (Slika 33), saj uporabljena gena za biosintetske encime izvirata iz rastlin, te pa za sintezo določenih aminokislin preferenčno uporabljajo drugačne kodone kot bakterije. Sklenili smo preizkusiti še sev Rosetta(DE3)pLysS s plazmidom pLysSRARE, ki vsebuje zapis za molekule tRNA, ki prevajajo redke kodone v *E.coli*.



Slika 33: HPLC kromatograma ekstraktov resveratrola po 20 urah fermentacije iz sevov BL21(DE3)pLysS (zgoraj) ter Rosetta(DE3)pLysS (spodaj) s transformiranim konstruktom Zif268:4CL PBSII:STS. V celicah seva Rosetta(DE3)pLysS je nastalo 4-krat več resveratrola kot v celicah seva BL21(DE3)pLysS. Površina vrha za sev BL21(DE3)pLysS je znašala 10285, za sev Rosetta(DE3)pLysS pa 41989.

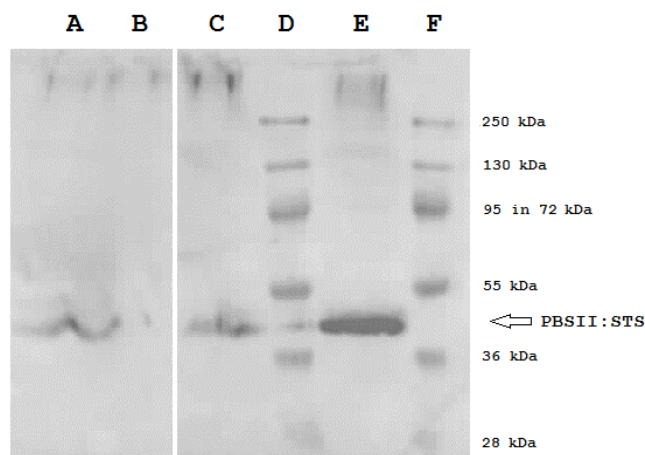
Celice *E.coli* seva Rosetta(DE3)pLysS z ekspresijskim vektorjem z zapisom za oba himerna biosintetska encima (Zif268:4CL in PBSII:STS) ter plazmidnimi vektorji s programsko DNA v 2, 4 in 16 kopijah smo inkubirali po postopku, opisanem v poglavju Metode in materiali (točka 3.2.5). Po HPLC analizi, ki so jih izvedli v Laboratoriju za prehransko kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani, smo dobili rezultate, predstavljene na sliki 34. Eksperimenti so bili ponovljeni več kot trikrat s primerljivimi rezultati.



**Slika 34: Primerjava sinteze resveratrola s himernimi biosintetskimi encimi v prisotnosti programske DNA ter praznega plazmidnega vektorja.** Graf prikazuje podatke vzorcev, odvzetih po 6 urah inkubacije bakterijskih kultur. Po 2 in 24 urah inkubacije so razlike približno enake, količine resveratrola pa manjše. Z 2 in 16 kopijami programske DNA ni bilo opaznih večjih razlik v primerjavi s praznim vektorjem, s 4 kopijami programske DNA pa je bila količina resveratrola skoraj 3-krat večja.

#### 4.2.2.1 Izražanje himernih proteinov

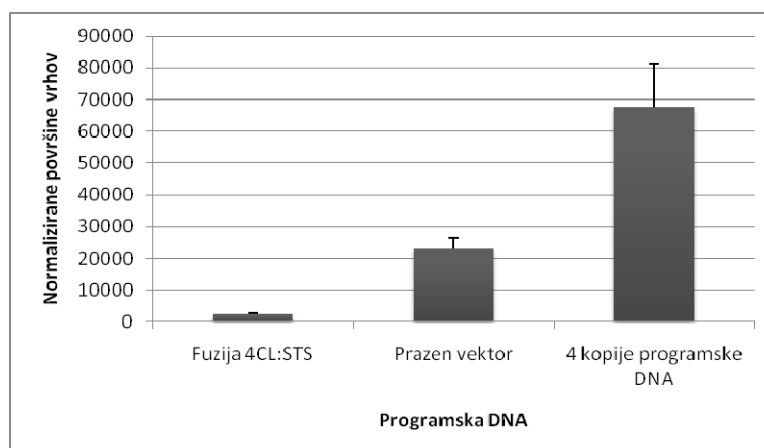
Želeli smo pokazati, da se encimi izražajo v približno enakih količinah. Molekulski masi himernih encimov smo izračunali z orodjem ProtParam (73 kDa za Zif268:4CL in 54 kDa za PBSII:STS). V standardnih razmerah po prenosu Western na membrani ni bilo vidnih nobenih lis (rezultati niso prikazani), zato smo postopek elektroforeze prilagodili in ponovili. Poliakrilamidni gel za SDS-PAGE elektroforezo je vseboval 8 M ureo, sama elektroforeza pa je potekala v TBE pufru z dodano 8 M ureo.



**Slika 35: Nitrocelulozna membrana po Western prenosu himernih encimov iz celičnega lizata.** Lise so vidne pri velikosti, ki ustreza encimu PBSII:STS, lis ki bi ustrezale encimu Zif268:4CL pa ni opaziti. Na progi A je vzorec celic s 16 kopijami programske DNA, na progi B s 4 kopijami, na progi C z dvema kopijama in na progi E s praznim vektorjem. Na progah D in F je proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

#### 4.2.2.2 Primerjava sinteze resveratrola s programsko DNA in s fuzijo encimov 4CL:STS

Za fuzijski protein 4CL:STS so že dokazali, da izboljša sintezo resveratrola v kvasovkah in sesalskih celicah, zato smo želeli primerjati učinkovitost našega sistema tudi z že obstoječimi izboljšavami.



**Slika 36: Primerjava sinteze resveratrola s programsko DNA in s fuzijo encimov 4CL in STS.** Vzorci so bili odvzeti po 6 urah inkubacije bakterijskih kultur. Že celice s praznim vektorjem so sintetizirale približno 10-krat več resveratrola kot celice s fuzijo encimov 4CL:STS, pri celicah s 4 kopijami programske DNA pa je bilo povečanje količine resveratrola skoraj 30-kratno.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Rekombinantni mikrobi večinoma željene produkte proizvajajo v zelo majhnih količinah (Anthony in sod., 2009), na omenjen način pa je tudi težko pridobivati kompleksnejše spojine rastlinskega ali živalskega izvora. Zadnja leta se zdi, da bo razvoj metabolnega inženiringa odpravil tudi te težave, vendar je do tja še dolga pot. Metabolni inženiring mikroorganizmov je zelo obetavno področje biotehnologije, vendar so tudi tu določene omejitve. Doseganje velikih količin končnih produktov zahteva uravnoveženje metabolnih tokov vseh encimskih reakcij v biosintetski poti in omejitev kopičenja celici škodljivih intermediatov (Dueber in sod., 2010; Fan in sod., 2010).

Do danes so razvili že najrazličnejše strategije optimizacije biosintetskih tokov, med drugim regulacija genske ekspresije (Anthony in sod., 2009; Dueber in sod., 2010; Kizer in sod., 2008; Vemuri in Aristidou, 2005), izboljševanje lastnosti encimov z usmerjeno evolucijo (Dueber in sod., 2010), kot najnovejši in najučinkovitejši pristop pa tudi približevanje encimov (Dueber in sod., 2010; Agapakis in sod., 2010; Delebecque in sod., 2011). V diplomski nalogi smo se osredotočili na približevanje biosintetskih encimov z njihovo vezavo na ogrodje DNA. Biosintetske encime so že vezali na proteinsko (Dueber in sod., 2010) in RNA ogrodje (Delebecque in sod., 2011), pristop vezave na DNA ogrodje pa še ni bil uporabljen.

#### 5.1.1 Primerjava DNA ogrodja z ostalimi strategijami približevanja encimov

Vezava biosintetskih encimov na proteinsko oziroma RNA ogrodje imata nekatere slabosti, ki bi jih bilo mogoče odpraviti z vezavo encimov na molekulo DNA. Proteinsko ogrodje uredi biosintetske encime v skupke (Dueber in sod., 2010), kar ne omogoča kontrole prostorske orientacije encimov. Vezava na RNA ogrodje sicer omogoča prostorsko ureditev vezanih proteinov, vendar je načrtovanje in sestavljanje RNA struktur za vezavo kompleksno (Delebecque in sod., 2011), sploh v primeru vezave več kot dveh biosintetskih encimov. Slednje je s proteinskim ogrodjem možno, vendar je število dobro opredeljenih

dimerizacijskih domen omejeno, poleg tega pa so njihove interakcije lahko različno močne, pravilno zvižanje pa poteka pod različnimi pogoji.

Zaradi svoje visoko predvidljive zgradbe molekula DNA omogoča prostorsko orientacijo vezanih proteinov. Ker dvojna vijačnica vsakih 10,5 baznih parov naredi obrat, lahko s spreminjanjem dolžine vmesnika med vezavnimi mesti kontroliramo, na katero stran vijačnice bodo vezani encimi obrnjeni. Poleg tega lahko zaradi njene linearnosti nadzorujemo tudi vrstni red vezanih proteinov in s tem vrstni red biokemijskih reakcij. Poznamo tudi veliko število že znanih proteinskih domen za vezavo na molekulo DNA, nekatere od teh (cinkove prste) pa je zaradi modularne zgradbe mogoče tudi načrtovati tako, da se vežejo na katerokoli željeno zaporedje nukleotidov (Pabo in sod., 2001; Isalan in Choo, 2001).

### 5.1.2 Izbira DNA vezavnih domen

Za vezavo na molekulo DNA morajo biosintetski encimi vsebovati DNA vezavno domeno. Preden smo pričeli s poskusi povečevanja izkoristka biosinteze, smo morali izbrati vezavne domene, ki se bodo dovolj učinkovito in specifično vezale na svoja prepoznavna zaporedja. Poleg tega spojitve s funkcionalnimi domenami oziroma encimi ne sme motiti aktivnosti slednjih.

Znanih je več strukturnih tipov DNA vezavnih domen, najbolj razširjeni in preučeni so motivi heliks-zavoj-heliks, levcinska zadruga in cinkovi prsti (Madigan in Martinko, 2006). Heliks-zavoj-heliks in levcinska zadruga se za naš projekt nista izkazala kot primerna zaradi dimerizacije ob vezavi na DNA (Madigan in Martinko, 2006). Najprimernejši so se tako že v začetku zdeli cinkovi prsti, zato smo sklenili njihove lastnosti bolje preveriti.

Cinkovi prsti v nasprotju s heliks-zavoj-heliks motivom in levcinsko zadrugo, vežejo asimetrična zaporedja in ob vezavi ne dimerizirajo (Madigan in Martinko, 2006). Eksperimentalno so prav tako že dokazali, da je mogoča njihova spojitve s funkcionalnimi domenami prek peptidnega povezovalca brez izgube funkcionalnosti (Stains in sod., 2005; Ooi in sod., 2006). Zaradi njihove modularne zgradbe (Klug, 2005) in znane cinkov prst-

DNA prepoznavne kode (Choo in Klug, 1994; Jamieson in sod., 1994) se odpirajo dodatne možnosti, naprimer sestavljanje novih DNA vezavnih proteinov, ki lahko prepoznajo katerokoli želeno zaporedje nukleotidov (Pabo in sod., 2001; Isalan in Choo, 2001). Zaradi vezave na asimetrična zaporedja se ponuja tudi možnost načrtovanja cinkovih prstov z daljšimi prepoznavnimi mesti. Najpogostejši so proteini s tremi prsti, ki vežejo 9 nukleotidov dolga zaporedja (Iuchi, 2005) – z združitvijo dveh takšnih domen bi dobili DNA vezavne domene, ki bi prepoznavale 18 nukleotidov dolga zaporedja.

Ena od možnosti, ki smo jo imeli na voljo, bi bila sinteza cinkovih prstov z afiniteto do kateregakoli nukleotidnega zaporedja *de novo*. Vendar so cinkovi prsti dobro preučeni, obstajajo celo podatkovne baze kot je naprimer ZiFDB (»zinc finger database«; Fu in sod., 2008), v katero je vnešeno več kot 700 cinkovih prstov z znanimi vezavnimi zaporedji. Zato smo se odločili za obratno pot – izbrali smo znane cinkove prste, za katere so že pokazali visoko afiniteto in specifičnost vezave, ter umetno sintetizirali molekulo DNA za njihovo vezavo. Sinteza molekul DNA je namreč danes že vsakdanja metoda v molekularni biologiji, sinteza novih cinkovih prstov pa bi bila zahtevnejša naloga. Cinkova prsta Zif268 in PBSII, ki smo ju uporabili pri tej diplomski nalogi, so že uporabili za spojitev s funkcionalnimi domenami. Vezavo nastalih himernih proteinov na DNA so pokazali prek ponovne sestavitve razpolovljenih proteinov (Stains in sod., 2005; Ooi in sod., 2006).

### 5.1.3 Preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov

Kljub temu, da je vezava izbranih cinkovih prstov že dobro poznana, smo se želeli prepričati, če so ti cinkovi prsti funkcionalni tudi v bakterijskem sistemu. Načrtovali in pripravili smo sistem (poglavje 4.1.1, slika 21) za preverjanje vezave katerihkoli DNA vezavnih proteinov, ki temelji na represiji gena za encim  $\beta$ -galaktozidazo. Ta encim je eden najbolj razširjenih reporterskih encimov (Boulin in sod., 2006), saj je njegovo aktivnost lahko merimo spektrofotometrično zaradi spremembe barve ob dodatku substrata, kar je zelo enostavna tehnika. Ekspresija gena *lacZ* je bila pod nadzorom sintetičnega promotorja  $p_{SYN}$ , ki je med mesti -35 in -10 vseboval vezavno zaporedje cinkovega prsta. V primeru vezave je bila preprečena vezava RNA polimeraze in encim se ni sintetiziral. Podoben promotor so za preverjanje vezave Tet represorja uporabili tudi Tahlan in sodelavci (2007).

Za regulacijo ekspresije cinkovih prstov smo uporabili inducibilni promotor  $p_{BAD}$ , reguliran z dodatkom L-arabinoze (Schleif in sod., 2000). Tako smo nadzorovali prisotnost oziroma odsotnost cinkovega prsta.

Po potrditvi nukleotidnih zaporedij kloniranih DNA konstruktov s kontrolnimi restrikcijami (Slika 25) in sekvenciranjem (Priloga A), nas je torej zanimala učinkovitost in specifičnost vezave izbranih cinkovih prstov. Uporabili smo sistema z vstavljenimi pravilnimi in napačnimi vezavnimi zaporedji za cinkova prsta Zif268 in PBSII ter celice s konstrukti inkubirali ob prisotnosti in odsotnosti L-arabinoze.

Slika 26 prikazuje aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze v Millerjevih enotah za celice z različnimi DNA konstrukti. Za oba testirana cinkova prsta je opazen podoben trend aktivnosti – v kolikor  $p_{SYN}$  promotor vsebuje pravo vezavno mesto, je aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze ob odsotnosti cinkovega prsta visoka, ob njegovi prisotnosti pa močno pade, kar pomeni učinkovito vezavo na promotor in preprečitev vezave RNA polimerazi. Slika 27 prikazuje učinkovitost vezave izbranih cinkovih prstov – večji je padec aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze, bolj učinkovita je vezava. Iz grafa je razvidno, da aktivnost za cinkov prst Zif268 pade za več kot 80 odstotkov, za cinkov prst PBSII pa za okrog 60 odstotkov. Iz dobljenih podatkov smo sklepali, da se oba cinkova prsta učinkovito vežeta na svoja prepoznavna zaporedja.

V primeru napačnega vezavnega mesta (na katerega naj se cinkov prst ne bi vezal), vstavljenega v  $p_{SYN}$  promotor, je tudi ob prisotnosti cinkovega prsta aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze visoka, zaradi česar lahko sklepamo, da se cinkova prsta vežeta tudi specifično. Primerjali smo tudi aktivnosti ob prisotnosti cinkovega prsta ter v promotor  $p_{SYN}$  vstavljenim napačnim ter pravim vezavnim zaporedjem (Slika 28). Iz grafa je razvidna velika razlika v aktivnosti, kar potrjuje specifičnost vezave obeh cinkovih prstov.

#### **5.1.4 Izbira biosintetske poti**

Po izbiri DNA vezavnih domen smo za uresničitev cilja diplomske naloge potrebovali še funkcionalne domene – biosintetske encime. Potrebno se je bilo odločiti za eno biosintetsko

pot, teh pa seveda obstaja ogromno število. Iskali smo pot, na kateri bi najlaže pokazali pravilnost teoretičnih predpostavk. Najprimernejša bi bila biosinteza spojine, katere detekcija je enostavna, ter za katero je že bilo pokazano, da rekombinantni biosintetski encimi v izbranem delovnem organizmu (*E.coli*) delujejo. Pri iskanju prave spojine smo naleteli na resveratrol, fenolno spojino, ki jo proizvajajo nekatere višje rastline, v velikih količinah pa jo najdemo v rdečem vinu (Wang in sod., 2010).

V preteklih letih so že pokazali, da je sinteza resveratrola mogoča z gensko spremenjenimi mikroorganizmi (Beekwilder in sod., 2006; Horinouchi, 2009; Katsuyama in sod., 2007; Sydor in sod., 2010; Watts in sod., 2006). Največ raziskav opisuje sintezo resveratrola v kvasovkah *Sacharromyces cerevisiae* in v bakteriji *Escherichia coli* z rekombinantnima encimoma 4-kumarat:CoA ligaza in stilben sintaza (White, 2009). Eno od metod približevanja biosintetskih encimov so že uporabili tudi za poskus izboljšanja izkoristka biosinteze resveratrola (Zhang in sod., 2006). V *S. cerevisiae* so avtorji ob dodatku 4-kumarne kisline pokazali 15-krat večjo produkcijo resveratrola s fuzijo encimov 4-kumarat:CoA ligaze in stilben sintaze kot v celicah s prostima encimoma.

### **5.1.5 Sinteza resveratrola z vezavo biosintetskih encimov na molekulo DNA**

#### **5.1.5.1 Izbira seva za produkcijo resveratrola**

Sprva je bil naš namen resveratrol sintetizirati v sevu *E.coli* BL21(DE3)pLysS, saj ta sev vsebuje zapis za T7 RNA polimerazo, ki je sposobna transkripcije genov pod regulacijo T7 promotorja. Plazmidni vektor z zapisom za himerna biosintetska encima smo transformirali v kompetentne celice omenjenega seva ter dobljeni sev inkubirali ob prisotnosti 1mM IPTG za indukcijo prepisovanja T7 RNA polimeraze ter 500 mM p-kumarne kisline, ki je substrat encima 4-kumarat:CoA ligaze. Tudi po 20 urah inkubacije so bile količine nastalega resveratrola majhne, skleпали pa smo, da je to posledica neoptimiziranih nukleotidnih zaporedij genov za biosintetska encima. Uporabljena gena namreč izvirata iz rastlin – gen za 4-kumarat:CoA ligazo izvira iz navadnega repnjakovca (lat. *Arabidopsis thaliana*), gen za stilben sintazo pa iz vinske trte (lat. *Vitis vinifera*), rastline pa za sintezo istih aminokislin preferenčno uporabljajo drugačne kodone kot bakterije (Madigan in



Martinko, 2006). Odločili smo se preizkusiti še sev Rosetta(DE3)pLysS, ki prav tako vsebuje zapis za T7 RNA polimerazo, na istem plazmidu pa še zapis za molekule tRNA, ki prevajajo redke kodone v *E.coli*. Konstrukt z zapisom za himerne biosintetske encime smo tako transformirali še v ta sev ter vzporedno s konstruktom v sevu BL21(DE3)pLysS celice inkubirali po enakem postopku kot v prejšnjem eksperimentu. Količina nastalega resveratrola je bila okrog štirikrat večja s sevom Rosetta(DE3)pLysS (Slika 33), zato smo se za nadaljnje eksperimente odločili uporabiti tega.

Po izbiri primernega seva smo iz celic, ki so že vsebovale konstrukt z zapisom za himerne biosintetske encime, pripravili kompetentne celice ter vanje transformirali plazmide z različnimi variantami programskih DNA. Ker so bile programske DNA na drugem plazmidu kot zapis za himerne biosintetske encime, je to zahtevalo prisotnost dodatnega antibiotika. Tako količine sintetiziranega končnega produkta z vezavo na programsko DNA ne bi bilo mogoče primerjati s celicami, ki so vsebovale samo plazmid s konstrukti za biosintetske encime, saj razmere rasti in produkcije zaradi dodatnega antibiotika ne bi bile enake. Ta problem smo rešili s transformacijo praznega vektorja, kar je zahtevalo dodatek enakega antibiotika ter tako omogočilo enake razmere in s tem primerjavo produkcije resveratrola.

#### 5.1.5.2 Vpliv števila dostopnih vezavnih mest za biosintetske encime

Produkcija resveratrola z vezavo encimov na programsko DNA je odvisna od števila dostopnih vezavnih mest, oziroma razmerja med številom encimskih molekul in številom vezavnih mest. Če je vezavnih mest premalo, večina encimov ostane prostih v citoplazmi, in učinek približevanja se tako zmanjša. Če pa je vezavnih mest preveč, se lahko encimi vežejo naključno in med njimi nastanejo večje razdalje, posledica tega pa je prav tako zmanjšan učinek približevanja, ki ga želimo doseči. Slednje so z uporabo metode SEER pokazali že Stains in sodelavci (2005). Prebitek molekul DNA z vezavnimi mesti za himerne proteine je inhibiral rekonstitucijo razpolovljenih fluorescentnih proteinov, spojenih s cinkovimi prsti. Po tem lahko sklepamo, da so se ti vezali na naključna, med seboj preveč oddaljena vezavna mesta.

Tako bi bilo najprej smiselno določiti približno število posameznih biosintetskih encimov v celici, kar bi bilo sicer mogoče z dodatkom različnega peptidnega označevalca vsakemu encimu, njuno izolacijo ter merjenjem koncentracije in preračunanjem števila glede na njuno molekularno maso. Vendar bi bil takšen postopek zahteven ter dolgotrajen glede na čas, namenjen za izdelavo te diplomske naloge, zato smo se odločili preprosto preizkusiti različna števila kopij programskih DNA. Uporabili smo plazmide v velikem številu kopij (100 do 300 kopij plazmida na celico) z 2, 4 in 16 kopijami programske DNA, kar pomeni povprečno 400, 800 oziroma 3200 vezavnih mest za vsak encim.

Z dvema in 16 kopijami programske DNA so razlike v primerjavi s praznim vektorjem praktično neopazne oziroma zelo majhne, pri 4 kopijah programske DNA pa je bilo povečanje količine nastalega resveratrola v primerjavi s praznim vektorjem skoraj trikratno (Slika 34). Prikazani rezultati so normalizirani glede na optično gostoto bakterijskih kultur, saj število celic v kulturi neposredno vpliva na količino nastalega produkta. Za normalizacijo smo se odločili zaradi večje korektnosti podatkov, vendar v našem primeru normalizacija niti ni nujno potrebna, saj so bile optične gostote vseh kultur približno enake (Priloga F). V kolikor bi bile kulture ob času odvzema vzorcev v različnih fazah rasti, rezultati ne bi bili primerljivi in bi jih bilo nujno potrebno normalizirati.

Dobljeni rezultati potrjujejo, da je izboljšanje izkupička biosinteze mogoče z vezavo biosintetskih encimov na molekulo DNA, hkrati pa potrjujejo hipotezo, da je izboljšanje odvisno od števila vezavnih mest. V našem primeru se je kot najboljša možnost izkazala kombinacija z okrog 800 vezavnimi mesti za vsak encim, vendar bi lahko rezultate še izboljšali bodisi z določitvijo približnega števila obeh encimov bodisi s preizkušanjem še več različnih variant programskih DNA. Slednje bi lahko kontrolirali tudi z uporabo plazmidov z inducibilnim številom kopij.

#### 5.1.5.3 Vpliv dolžine vmesnika med vezavnimi mesti

Vezavna mesta za himerne encime so ločena z vmesniki (spacerji) – nukleotidi, ki niso del vezavnih zaporedij. Njihova dolžina ni naključna, ampak sledi tridimenzionalni strukturi molekule DNA. En zavojev vijčnice je dolg 10,5 baznih parov – da bi bile encimske domene

himernih proteinov ob vezavi na isti strani vijačnice DNA, je pomembno izbrati pravo dolžino vmesnika. Da dolžina vmesnika vpliva na prostorsko ureditev vezanih proteinov, so dokazali že Ooi in sodelavci (2006) z uporabo metode SEER. Prav tako kot mi so uporabili cinkova prsta Zif268 in PBSII ter 0, 6 in 10 nukleotidov dolge vmesnike med vezavnimi mesti. Njihovi rezultati so pokazali največjo rekonstitucijo razpolovljene  $\beta$ -laktamaze pri 0 in 10 nukleotidov dolgih vmesnikih, kjer sta bili obe polovici encima na isti strani vijačnice, najmanjšo pa pri 6, kjer sta bili polovici na nasprotni strani vijačnice.

Ker smo pri diplomski nalogi kot vezavne domene uporabili cinkove prste, ki se vežejo na 9 nukleotidov dolga zaporedja, smo sklepali, da bi vmesnik 1-2 nukleotidov uredil encimske domene na isto stran dvojne vijačnice, medtem ko bi jih vmesnik 4-6 nukleotidov uredil na nasprotno stran vijačnice. Kljub temu, da so Ooi in sodelavci (2006) pokazali največjo rekonstitucijo pri vezavnih mestih brez vmesnika, bi lahko pri tej varianti prišlo do prostorskega oviranja encimov zaradi njihove različne velikosti ter zaradi različnih dolžin peptidnih povezovalcev med cinkovim prstom in encimom. Pri naših poskusih smo se tako izognili neželenim zapletom in uporabili vmesnik, dolg 2 nukleotida. V izvedbi diplomskega dela smo želeli preizkusiti tudi drugačne dolžine vmesnikov (4 in 8 nukleotidov), vendar nam zaradi pomanjkanja časa teh poskusov ni uspelo izvesti.

#### 5.1.5.4 Dokazovanje izražanja biosintetskih encimov

Želeli smo pokazati, da se biosintetski encimi zares izražajo v približno enakih količinah pri različnih variantah prisotne programske DNA, saj v primeru različnih stopenj izražanja rezultati ne bi bili primerljivi. Ker so bili encimi označeni s heksahistidinskim označevalcem, smo jih poskusili dokazati s prenosom na nitrocelulozno membrano. Po običajnem postopku SDS elektroforeze in prenosa na membrano encimov ni bilo opaziti niti pri najboljčutljivejšem reagentu (podatki niso prikazani).

Ker je resveratrol kljub temu nastajal, smo se vprašali, čemu encimov na membrani ne vidimo. Ena od možnosti bi bila, da bi celice izgubile plazmid s himernimi encimi, vendar so se celice razmnoževale ob prisotnosti antibiotika, vse prisotne plazmide pa smo izolirali ter jih ločili na agaroznem gelu (rezultati niso prikazani). Po razmisleku smo se odločili

postopek elektroforeze prilagoditi, tako da smo proteine čimbolj denaturirali, s čimer smo dosegli lažje potovanje skozi gel zaradi zmanjšanja agregacije.

Po prilagojenem postopku je bilo na membrani opaziti lise, ki bi po velikosti lahko ustrezale proteinu PBSII:STS (Slika 35), vendar tega ne moremo zagotovo trditi, saj se v prisotnosti uree proteini obnašajo drugače kot v običajnih razmerah elektroforeze – celo proteinska lestvica se je ločila drugače, kot je navedeno v navodilih proizvajalca. Še vedno pa na membrani ni opaziti lis, ki bi ustrezale proteinu Zif268:4CL.

#### 5.1.5.5 Primerjava sistema z že obstoječimi izboljšavami

Ker je bila že predhodno uporabljena metoda izboljšave biosinteze resveratrola (fuzija encimov 4-kumarat:CoA ligaze in stilben sintaze; Zhang in sod., 2006), smo se odločili primerjati slednjo z našim sistemom. Ker smo gene za oba encima s PCR reakcijo dobili iz plazmida s tem fuzijskim proteinom, je bilo najprej ključno preveriti, ali sinteza resveratrola v *E.coli* z aktivacijo genov za ustrezne encime potrebne za njegovo biosintezo sploh nastaja. Ko smo ugotovili, da je s fuzijo encimov mogoče pridobiti resveratrol v izbranem sevu (rezultati niso prikazani), smo v kompetentne celice Rosetta(DE3)pLysS transformirali tudi ekspresijski vektor z zapisom za ta protein. Celice smo inkubirali vzporedno s celicami s konstrukti himernih encimov in programske DNA. Iz grafa (Slika 36) je razvidno, da že samo fuzija biosintetskih encimov s cinkovimi prsti v primerjavi s fuzijo samih encimov izboljša produkcijo resveratrola za skoraj 10-krat, z vezavo na DNA ogrodje pa se količina končnega produkta poveča skoraj 30-krat.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je naš sistem boljši od proteinske fuzije 4CL:STS. Zaključimo lahko, da se s fuzijo encimov 4CL:STS resveratrol v bakterijskem sistemu slabše proizvaja, vezava encimov na DNA ogrodje pa izboljša izkoristek biosinteze.

#### 5.1.6 Omejitve sistema

Sinteza spojin z vezavo encimov na molekulo DNA ima poleg svojih prednosti tudi določene omejitve. Sistem ni primeren za uporabo v evkariontskih celicah zaradi

prostorsko ločenih procesov podvajanja, prepisovanja in prevajanja molekul DNA. Čeprav so bakterijske celice dober in enostaven sistem za izražanje rekombinantnih proteinov, lahko prihaja do težav pri njihovem pravilnem zvitju in glikozilaciji, če ti izvirajo iz višjih organizmov.

V bakterijskih sistemih se običajno uporabljajo plazmidni vektorji. Ti so v celici v superzaviti obliki, kar zmanjša število dostopnih vezavnih mest za himerne encime. To bi lahko preprečili z integracijo programske DNA v genom bakterije.

V primeru programske DNA gre za ponavljajoča nukleotidna zaporedja, zaradi česar lahko pride do rekombinacije in s tem izreza večjega dela vezavnih mest. Tako je pri produkciji potrebno uporabljati bakterijske seve, ki ne vsebujejo zapisa za rekombinazo (*recA*), vendar v primeru *E.coli* to ni težava, saj je takšnih sevov veliko in so tudi komercialno dostopni.

## 5.2 SKLEPI

Na primeru sinteze resveratrola smo pokazali skoraj trikratno povečanje količine sintetiziranega produkta ob vezavi dveh biosintetskih encimov (*Zif268:4CL* in *PBSII:STS*) na molekulo DNA. Potrdili smo hipotezo, da je število dostopnih vezavnih mest pomembno za usmerjanje in pospešitev metabolnega toka. Pokazali smo tudi skoraj 30-kratno razliko v količini sintetiziranega resveratrola v primerjavi s fuzijo encimov *4CL* in *STS*, so že pokazali, da poveča količino nastalega resveratrola.

Pripravili smo biološki sistem, uporaben za preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave katerikoli DNA vezavnih proteinov. Z njim smo testirali vezavo dveh cinkovih prstov (*Zif268* in *PBSII*) ter pokazali, da se na svoja vezavna zaporedja vežeta učinkovito in specifično.

Rezultati eksperimentov, izvedenih pri pripravi diplomskega dela, so pomembni za nadaljnje raziskave na področju uporabe programske DNA za izboljšanje in optimizacijo biosintetskih poti ter aplikacije omenjenega principa v industriji.

## 6 POVZETEK

Metabolni inženiring je zelo obetavno področje molekularne biologije, na katerem je bilo v zadnjih letih opravljeno mnogo raziskav, ki so izboljšale mikrobno produkcijo nekaterih pomembnih organskih spojin. Vendar je ta smer še zelo mlada in v zadnjem času hitro napreduje. Do danes so bile preizkušene že mnoge metode metabolnega inženiringa, med najuspešnejšimi približevanje encimov in s tem usmerjanje ter optimizacija metabolnega toka. Fuzije biosintetskih encimov ter njihova vezava na proteinsko ter RNA ogrodje so najnovejše tehnike, uporabljene za ta namen, imajo pa tudi nekatere slabosti, ki jih je mogoče izboljšati z njihovo vezavo na DNA ogrodje.

Vezava biosintetskih encimov na ogrodje DNA do danes še ni bila uporabljena za optimizacijo metabolnega toka. Zaradi linearnosti in predvidljive zgradbe dvojne vijačnice je mogoča kontrola prostorske orientacije ter vrstnega reda encimov, sinteza molekul DNA je enostavna in splošno uporabljena tehnika v molekularni biologiji, poleg tega pa so DNA vezavne domene dobro okarakterizirane, imajo podobne lastnosti in njihova izbira je zelo široka.

V diplomskem delu smo se osredotočili na vezavo biosintetskih encimov, spojenih z DNA vezavnimi domenami, na vnaprej načrtovano ogrodje DNA in s tem izboljšanje metabolnega toka. Za dokaz principa smo kot modelno spojino uporabili resveratrol, fenolno spojino, najpogosteje prisotno v rdečem vinu, ki ima mnoge pozitivne lastnosti.

Po dokazu učinkovite in specifične vezave izbranih DNA vezavnih domen, cinkovih prstov Zif268 in PBSII, smo z molekularno biološkimi metodami nanje s peptidnim povezovalcem pripeli biosintetska encima za sintezo resveratrola, 4-kumarat:CoA ligazo in stilben sintazo. Plazmidne vektorje z zapisom za himerne biosintetske encime smo transformirali v celice *Escherichia coli* ter v kompetentne celice dobljenega seva transformirali še plazmidne vektorje s programsko DNA. Z vezavo encimov na ogrodje DNA smo dokazali 3-kratno povečanje količine končnega produkta v primerjavi z encimi, prosto razporejenimi v citoplazmi.

Z nadaljnji eksperimenti in optimizacijo procesa bi najverjetneje lahko izkoristek sinteze resveratrola še izboljšali. Princip pa ni primeren le za sintezo te spojine, temveč tudi drugih, bodisi terapevtsko bodisi industrijsko pomembnih spojin, naprimer biogoriv. Na DNA ogrodje je mogoče vezati tudi večje število biosintetskih encimov, ter s kontrolo vrstnega reda vezanih encimov preprečiti vejitev biosintetskih poti in s tem onemogočiti nastanek neželenih stranskih produktov.

Rezultati, pridobljeni v tej diplomski nalogi, imajo velik pomen pri nadaljnjem razvoju metabolnega inženiringa in tudi pri uporabi omenjenega principa v industrijskih aplikacijah za mikrobo produkcijo organskih spojin.

## 7 VIRI

Agapakis C.M., Ducat D.C., Boyle P.M., Wintermute E.H., Way J.C., Silver P.A. 2010. Insulation of a synthetic hydrogen metabolism circuit in bacteria. *Journal of Biological Engineering*, 4: 3-18

Anthony J.R., Anthony L.C., Nowroozi F., Kwon G., Newman J.D., Keasling J.D. 2009. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of anti-malarial drug precursor amorpha-4-11-diene. *Metabolic Engineering*, 11, 1: 13-19

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*. 5<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.

Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. 1943. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79: 137-158

Beekwilder J., Wolswinkel R., Jonker H., Hall R., de Vos C.H., Bovy A. 2006. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 8: 5670-5672

Berg J.M. 1988. Proposed structure for the zinc finger binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 99-102

Boulin T., Etchberger J.F., Hobert O. 2006. Reporter gene fusions. V: Wormbook. New York, The *C. elegans* Research Community, doi:/10.1895/wormbook.1.106.1: 23 str.

[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_reportergenefusions/reportergenefusions.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_reportergenefusions/reportergenefusions.pdf)

(julij 2011)



BVTech Plasmid. 2011a. Plasmid map of pET-19b. Seattle, BVTech Plasmid: 1 str.  
<http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET-19b.htm> (maj 2011)

BVTech Plasmid. 2011b. Plasmid map of pET28a. Seattle, BVTech Plasmid: 1 str.  
<http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET28a.htm> (maj 2011)

Choo Y., Isalan M. 2000. Advances in zinc finger engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 411-416

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 Sciences of the United States of America*, 91, 23: 11163-11167

Corbi N., Libri V., Passananti C. 2005. Synthetic zinc finger transcription factors. V: Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Plenum Publishers: 47-55

Dahm R. 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278: 274-288

Delebecque C.J., Lindner A.B., Silver P.A., Aldaye F.S. 2011. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, 333, 6041: 470-474

Desjarlais J.R., Berg J.M. 1992a. Redesigning the DNA-binding specificity of a zinc finger protein: A data base-guided approach. *Proteins*, 12, 2: 101-104

Desjarlais J.R., Berg J.M. 1992b. Towards rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 16: 7345-7349

Desjarlais J.R., Berg J.M. 1993. Use of a zinc finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6: 2256-2260

Dhanasekaran M., Negi S., Sugiura Y. 2005. Designer zinc finger proteins: Tools for creating artificial DNA-binding functional proteins. *Accounts of Chemical Research*, 39, 1: 45-52

Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., Seok Moon T., Petzold C.J., Ullal A.V., Prather K.L.J., Keasling J.D. 2010. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnology*, 27, 8: 753-761

Fan C., Cheng S., Liu Y., Escobar C.M., Crowley C.S., Jefferson R.E., Yeates T.O., Bobik T.A. 2010. Short N-terminal sequences package proteins into bacterial compartments. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, 107, 16: 7509-7514

Fu F., Sander J.D., Maeder M., Thibodean-Beganny S., Joung J.K., Dobbs D., Miller L., Voytas D.F. 2008. Zinc finger database (ZiFDB): A repository for information on C2H2 zinc fingers and engineered zinc finger arrays. *Nucleic Acids Research*, 37, 1: 279-183

Ganss J., Jheon A. 2004. Zinc finger transcription factors in skeletal development. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15, 5: 282-297

Griffith F. 1928. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 27, 2:113-159. Cit po: Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. 1943. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79: 137-158

Gu X., Creasy L., Kester A., Zeece M. 1999. Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 8: 3223-3227

Hershey A.D., Chase M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 36: 39-56

Horinouchi S. 2009. Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 2: 197-204

Isalan M., Choo Y. 2001. Rapid, high-throughput engineering of sequence-specific zinc finger DNA binding proteins. *Methods in Enzymology*, 340: 593-609

Iuchi S. 2005. C2H2 zinc fingers as DNA binding domains. V: Zinc finger proteins: From atomic contact to cellular function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Plenum Publishers: 7-13

Jamieson A.C., Kim S.H., Wells J.A. 1994. *In vitro* selection of zinc fingers with altered DNA-binding specificity. *Biochemistry*, 33, 19: 5689-5695

Katsuyama Y., Funa N., Miyahisa I., Horinouchi S. 2007. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chemistry and Biology*, 14, 6: 613-621

Kim J.-S., Pabo C.O. 1998. Getting a handhold on DNA: Design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 2812-2817

Kizer L., Pitera D.J., Pfleger B.F., Keasling J.D. 2008. Application of functional genomics to pathway optimization for increased isoprenoid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 10: 3229-3241

Klug A. 2005. The discovery of zinc fingers and their practical applications in gene regulation: A personal account. V: Zinc finger proteins: From atomic contact to cellular function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Plenum Publishers: 1-6

Lachenmann M.J., Ladbury J.E., Phillips N.B., Narayana N., Qian X., Weiss M.A. 2002. The hidden thermodynamics of a zinc finger. *Journal of Molecular Biology*, 316, 4: 969-989

Langcake P., Pryce R.J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection and injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 1: 77-86

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

Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas C.F. 1997. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 5525-5530

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11<sup>th</sup> ed. London, Pearson Education LTD: 992 str.

Magee J.B., Smith B.J., Rimando A.M. 2002. Resveratrol content of muscadine berries is affected by disease control spray program. *Hortscience*, 37:358-361

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

Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. 2001. Overcoming the codon bias of *E.coli* for enhanced protein expression. *InNovations*, 12: 1-3

Ooi A.T., Stains C.I., Ghosh I., Segal D.J. 2006. Sequence-Enabled Reassembly of  $\beta$ -lactamase (SEER-LAC): A sensitive method for the detection of double stranded DNA. *Biochemistry*, 45: 3620-3625

Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A. 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 313-340

Pabo C.O., Sauer R.T. 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 1053-1095

Pavlovich 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

Picard B., Wegnez M. 1979. Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA-protein complex. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 76: 241-145

Ro D.-K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C.Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440: 949-943

Schleif R. 2000. Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in Genetics*, 16, 12: 559-565

Shetty R.P., Endy D., Knight T.F. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2: 5-5

Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. 1997. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11, 5:287-313

Sri Krishna S., Majumdar I., Grishin N.V. 2003. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research*, 31, 2: 532-550

Stains C.I., Porter J.R., Ooi A.T., Segal D.J., Ghosh I. 2005. DNA Sequence-Enabled Reassembly of the green fluorescent protein. *Journal of American Chemical Society*, 127: 10782-10783

Sydor R., Schaffer S., Boles E. 2010. Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 10: 3361-3363

iGEM. 2010. Ljubljana. Team:Slovenia/PROJECT/introduction. Team:Slovenia – 2010.igem.org.

<http://2010.igem.org/Team:Slovenia/PROJECT/introduction> (maj 2011): 1 str.

Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F. 2009. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 11, 6: 355-366

Vemuri N.G., Aristidou A.A. 2005. Metabolic engineering in the –omics era: Elucidating and modulating regulatory networks. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 2: 197-216

Wang Y., Chen H., Yu O. 2010. Metabolic engineering of resveratrol and other longevity boosting compounds. *BioFactors*, 36, 5: 394-400

Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 4356: 737-738

Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C. 2006. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 6, 22, doi:10.1186/1472-6750-6-22: 12 str.

White E. 2009. Current status of metabolically engineered resveratrol. *Basic Biotechnology*, 5: 84-90

Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 29: 183-212

Yeates T.O., Kerfeld C.A., Heinhorst S., Cannon G.C., Shivery J.M. 2008. Protein-based organelles in bacteria: Carboxysomes and related microcompartments. *Nature Reviews*, 6: 681-691

Zhang Y., Li S.-Z., Pan X., Cahoon R.E., Jaworski J.G., Wang X., Jez J.M., Chen F., Yu O. 2006. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *Journal of American Chemical Society*, 128: 13030-13031

## ZAHVALA

Najprej hvala prof. dr. Romanu Jerali za neprecenljivo priložnost sodelovanja pri projektu iGEM 2010, ter za možnost opravljanja diplomskega dela na Kemijskem inštitutu in vse pridobljene izkušnje. Hvala tudi mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu ter recenzentu prof. dr. Tomu Turku za hiter in natančen pregled diplomske naloge.

Hvala vsem sodelujočim pri projektu iGEM 2010, tako študentom kot mentorjem. Brez vas to diplomsko delo ne bi bilo mogoče. Še posebej hvala Roku G. in Tomiju za vso pomoč, nasvete in kritike, ter Jerneju za skupne laboratorijske dogodivščine. Katja in Vida, hvala za občasne smiselne in tudi nesmiselne pogovore, ter s tem popestritev vsakdanjega laboratorijskega življenja. Hvala dr. Ireni Vovk, Vesni ter Mateji iz laboratorija L-06 za HPLC kromatografije, predvsem pa za vso prijaznost in trud. Hvala tudi vsem zaposlenim v laboratoriju L-12, za prenašanje mojega težkega karakterja. Vem, da ni bilo lahko.

Hvala vsem prijateljem, ki to ostajajo kljub mojemu alter-egu, ki se je občasno prebujal ob izdelavi pričujočega dela. Nekateri ste posebej potrpežljivo prenašali moje transformacije v grozovito pošast, in si zato zaslužite posebno mesto v mojem srcu, ter tako tudi v tej diplomski nalogi. Andraž. Hvala, ker si mi vsake toliko časa pokazal, da obstaja svet izven laboratorija. Aleš. Hvala za velikodušne prelevitve v mojega osebnega taksista, ter za vso ostalo podporo. Ana, sekica za uvijek. Pri meni boš z dunajskim zrezkom vedno dobila šnavcerja, v usnjenih hlačah pa te bo čakalo kislo zelje. Tjaša, Uroš, Luki, Schlangemann, Maja, Maša, DiEl, Zazi, bivše cimrce, Matic, Vid in ostali. Zaradi vas vem, da nisem edina abnormalna oseba na planetu, kar je vredno več kot sirova štručka z zeljem. Hvala.

Predraga mati, tetka, Dušan, Ivo, dragi oča in ostali. Hvala, ker že skoraj 24 let verjamete vame, me podpirate na vseh področjih in mi stojite ob strani pri vseh (pravih) odločitvah. Ne predstavljam si, kako bi mi brez vas uspelo priti do tu, kjer sem danes.

Za konec še zahvala prijatelju Niklasu, ki kljub 1500 kilometrom zračne razdalje in zvezdniškemu življenju še vedno najde čas zame. Nille, thank you for giving me something to look forward to these past few months and therefore keeping me from losing my mind.



## PRILOGE

Priloga A: Nukleotidna zaporedja obeh delov sistema za preverjanje učinkovitosti vezave DNA vezavnih proteinov ter vstavljenih cinkovih prstov in njihovih vezavnih zaporedij

DTER-p<sub>SYN</sub>-*Bbs*I:

CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCT  
ACTAGAGTCACACTGGCTCGACCTTCGGGTGGGCCTTTCGCGTTTATAACTAGATTGACATAGTCTTCGCGAGCCGAAGA  
CTATTATTTTACC

RBS-*lacZ*-DTER-p<sub>BAD</sub>-RBS-*Bsa*I-DTER:

GAAAGAGGAGAAATACTAGATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTG  
GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC  
CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTCGCTGTTTCCGGCACCGAAGCGGTGCCGAAAAGCTGG  
CTGGAGTGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCGCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTAC  
ACCAACGTGACCTATCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTT  
AATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTGGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGC  
AACGGGCGCTGGTTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTCCGCTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGA  
AAACCGCCTCGCGGTGATGGTGTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCA  
TTTTCCGTGACGCTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATT  
CAGCCGCGTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGC  
AGGGTGAACGCGAGTGCACGCGCACCGCGCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGC  
GTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGGTTGTTGAACT  
GCACACCGCCGACGGCAGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGC  
TGCTGTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCTCTGCATGGTCAGGTGATGGATG  
AGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACCTTAACGCCGTCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCAT  
CCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCC  
AATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGGATCGTA  
ATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATC  
AAATCTGTGCATCTTCCCGCCCGGTGACGATATGAAGCGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTTTGGCCGAT  
GTACGCGCGCTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAG  
AGACGCGCCGCTGATCTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCG  
TTTCGTGATATCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATATGATGAAAACGGC  
AACCCGTGGTTCGGCTTACGGCGGTGATTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCC  
GACCGCACGCCGATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCGTTTATCCGGGCAACCAT  
CGAAGTGACAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGC  
TGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAG  
AGCGCCGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCG  
CCTGGCAGCAGTGGCTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCGCTCCACGCCATCCCGCATCTGACCACC  
AGCGAAATGGATTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTCTTTACAGATGTGG  
ATTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAA  
TGAAGCGACCCGATTGACCTAACGCTGGGTGGAACGCTGGAAGGCGCGGGCCATTACCAGCCGAAGCAGCGTTGT  
TGCAGTGCACGGCAGATACACTTGTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTA  
TTTATCAGCCGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATAC

ACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAACTGGCTCGGATTAGGGCCG  
CAAGAAAATATCCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTAC  
GTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGGAATTGAATTATGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCA  
GTTCAACATCAGCCGTACAGTCAACAGCAACTGATGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACAT  
GGCTGAATATCGACGGTTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTG  
AGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA**ACTAGACCAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAG**  
**TCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCGACCTTCGGGT**  
**GGGCCTTCTGCGTTTATAACTAGATTATGACAACCTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTACAAACCGGCACGGA**  
**GCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGG**  
**TGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAAGCAGCTTCGCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTA**  
**ATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAA**  
**AATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGT**  
**TAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCTTGCC**  
**CGGCGTAAATGATTGCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCA**  
**AATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATAACCATTGCGGAGC**  
**CTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAAAACAAATTCTCGTC**  
**CCTGATTTTTACCACCCCTGACCGCAATGGTGAGATTGAGAATAAACCTTTCATTCCAGCGGTGGTGCATAAAAA**  
**AATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGCGCTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGA**  
**TCATTTTGCCTTCAGCCATACTTTTCACTCCCGCCATTAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCC**  
**GTCACCTGCGCTTTTACTGGCTTCTCGCTAACCAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGA**  
**CCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTC**  
**ACACTTGGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTT**  
**CTCCATACCGTTTTTTGGGCTAGCACTAGAAAAGAGGAGAAA**ACTAGAGAGACCAAGCTTGC**CGCATGCAT**GGTCTCG****  
**GGCCACTAGACCAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGT**  
**AACGCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCGACCTTCGGGTGGGCCTTCTGCGTTATA**

Legenda:

**dvojni terminator (DTER)**

**p<sub>SYN</sub> promotor s prepoznavnimi mesti za restriksijski encim *BbsI***

**Elowitz ribosomsko vezavno mesto (RBS)**

**gen za  $\beta$ -galaktozidazo (*lacZ*)**

**p<sub>BAD</sub> promotor z genom za represor AraC**

**mesto za vkloniranje cinkovih prstov s prepoznavnimi mesti za restriksijski encim *BsaI***

**mešana mesta, nastala pri kloniranju**

## Priloga B: Nukleotidna zaporedja genov za cinkove prste ter uporabljenih vezavnih zaporedij

### Zif268:

ATGACTAGACCGGGTGAAAAACCGTATGCATGTCCGGTTGAAAGCTGTGATCGTCGTTTTAGCCGTAGTGATGAACTGAC  
CCGTCATATTCGTATTCATACAGGTCAGAAACCGTTTCAGTGTGCTATTTGCATGCGTAATTTAGCCGTTTCAGATCATCTG  
ACCACCCATATTCGTACCCATACTGGCGAAAAACCGTTTGCTGTGATATTTGTGGTCGTAAATTTGCACGTTCCGATGAA  
CGTAAACGCCATACCAAAATTCATACGGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTTCAGGTGGTAGTACTAGATAA

### PBSII:

ATGACTAGACCGGGTGAAAAACCGTATGCATGTCCCTGAATGTGGTAAAAGCTTTAGCCAGCGTGCAAATCTGCGTGACA  
TCAGCGTACCCATACAGGTGAAAAGCCTTATAAATGCCGAGAATGCGGCAAAAAGCTTTTCACGTAGCGATCATCTGACCA  
CCCATCAGCGCACACATACTGGCGAGAAACCTTACAAATGTCCAGAGTGTGGTAAATCATTAGCCGTAGTGATGTTCTG  
GTTCTGCATCAGAGAACCACACGGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTTCAGGTGGTAGTACTAGATAA

Prileganje začetnih oligonukleotidov za vstavitev vezavnega mesta Zif268 ( $O^{Zif268}$ ) v promotor  $p_{SYN}$ :

GACACGAAACCGTGGGCGCAAT  
GCTTCGCACCCGCGTTAAATA

Prileganje začetnih oligonukleotidov za vstavitev vezavnega mesta PBSII ( $O^{PBSII}$ ) v promotor  $p_{SYN}$ :

GACACGAAAGTGTGGAAACAAT  
GCTTCACACCTTTGTTAAATA

Prileganje začetnih oligonukleotidov promotorja  $p_{SYN}$  z vezavnim mestom TetR ( $O^{Tet}$ ):

CTAGATTGACACTCTATCAATGATAGAGTTATTTACCACTAGTGCAGCCGCTGCA  
TAACTGTGAGATAGTTACTATCTCAATAAAATGGTGATCACGCCGGCG

### Legenda:

ATG START kodon

TAA STOP kodon

peptidni povezovalci

štrleči konci za ligacijo v mesto, nastalo ob cepitvi promotorja  $p_{SYN}$  z restriksijskim encimom *BbsI*

štrleči konec za ligacijo v vektor, cepljen z restriksijskim encimom *XbaI*

štrleči konec za ligacijo v vektor, cepljen z restriksijskim encimom *PstI*

nukleotidno zaporedje cinkovega prsta Zif268

nukleotidno zaporedje cinkovega prsta PBSII

nukleotidno zaporedje vezavnega mesta za cinkov prst Zif268

nukleotidno zaporedje vezavnega mesta za cinkov prst PBSII

nukleotidno zaporedje vezavnega mesta za TetR

## Priloga C: Nukleotidno zaporedje himernih biosintetskih encimov Zif268:4CL in PBSII:STS s promotorjem T7 in terminatorjem T7

TAATACGACTCACTATAGCGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGACCTAGGAGCGCTAGGAGGCCACCATGC  
ATCATCATCATCATCATCCGGGTGAAAAACCGTATGCATGTCCGGTTGAAAGCTGTGATCGTCGTTTTAGCCGTAGTGATG  
AACTGACCCGTCATATTTCGTATTACATACAGGTACAGAAACCGTTTCAGTGTCTGATTTGCATGCGTAATTTAGCCGTTTCAG  
ATCATCTGACCACCCATATTCGTACCATACTGGCGAAAAACCGTTTGCCTGTGATATTTGTGGTCGTAATTTGCACGTT  
CCGATGAACGTAACGCCATACAAAATTCATACGGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTTCAGGTGGTAGTATGGCGCCACAA  
GAACAAGCAGTTTTCTCAGGTGATGGAGAAACAGAGCAACAACAACAACAGTGACGTCATTTCCGATCAAAGTTACCGG  
ATATTTACATCCCGAACCCATCTCTCCACGACTACATCTTCCAAAACATCTCCGAATTCGCCACTAAGCCTTGCTAAT  
CAACGGACCAACCGGCCACGTGTACACTTACTCCGACGTCCACGTCTCTCCGCCAAATCGCCGCCAATTTTCACAAACT  
CGGGCTTAACAAAACGACGTCGTATGCTCCTCCTCCAAAACGTCGCCAATTCGTCCTCTCTTCTCGCCGCTCCTTC  
CGCGGCGCAACCGCCACCGCCGCAACCCCTTCTTCACTCCGGCGGAGATAGCTAAACAAGCCAAAGCCTCCAACACCAA  
ACTCATAATCACCGAAGCTCGTTACGTGACAAAAACAACCACTTCAAACGACGACGGAGTAGTCATCGTCTGCATCG  
ACGACAACGAATCCGTGCCAATCCCTGAAGGCTGCCTCCGCTTACCGAGTTGACTCAGTCGACAACCGAGGCATCAGAA  
GTCATCGACTCGGTGGAGATTTACCGGACGACGTGGTGGCACTACCTTACTCCTCTGGCAGCAGCGGATTACAAAAGG  
AGTGATGCTGACTCACAAGGGACTAGTCACGAGCGTTGCTCAGCAAGTCGACGGCGAGAACCAGAATCTTTATTTCCACA  
GCGATGACGTCATACTCTGTGTTTGCCCATGTTTCATATCTACGCTTTGAACTCGATCATGTTGTGTGGTCTTAGAGTTGG  
TGCGGCGATTCTGATAATGCCGAAGTTGAGATCAATCTGCTATTGGAGCTGATCCAGAGGTGTAAGTGACGGTGGCTC  
CGATGGTTCCGCCGATTGTGTTGGCCATTGCGAAGTCTTCGGAGACGGAGAAGTATGATTTGAGCTCGATAAGAGTGGTG  
AAATCTGGTGTCTCCTCTTGGTAAAGAACCTGAAGATGCCGTTAATGCCAAGTTTCCCTAATGCCAAACTCGGTACGGGA  
TACGGAATGACGGAAGCAGGTCCAGTGCTAGCAATGCTGTTAGGTTTTGCAAAGGAACCTTTCCGGTAAAGTCAGGAGC  
TTGTGGTACTGTTGTAAGAAATGCTGAGATGAAAATAGTTGATCCAGACACCGGAGATTCTCTTCGAGGAATCAACCCG  
GTGAGATTTGATTCGTGGTACCAGATCATGAAAGGTTACCTCAACAATCCGGCAGCTACAGCAGAGACCATTGATAAA  
GACGGTTGGCTTACTGAGATATTTGATTGATCGATGACGATGACGAGCTTTTCATCGTTGATCGATTGAAAAGAACT  
ATCAAGTATAAAGGTTTTAGGTAGCTCCGGCTGAGCTAGAGGCTTTGCTCATCGGTATCCTGACATTACTGATGTTGCT  
GTTGTGCAATGAAAGAAGAAGCAGCTGGTGAAGTCTGTTGCATTTGTGGTGAATCGAAGGATTCGGAGTTATCAGA  
AGATGATGTGAAGCAATTCGTGTCGAAACAGGTTGTGTTTTACAAGAGAATCAACAAAGTGTCTTCACTGAATCCATTCC  
TAAAGCTCCATCAGGGAAGATATTGAGGAAAGATCTGAGGGCAAACTAGCAAATGGATTCTAAGTATACAGAGGAGA  
ATTAAGCATGCACCACCACCACCACCCGGGTGAAAAACCGTATGCATGTCTGAATGTGGTAAAAAGCTTTAGCCAGC  
GTGAAAATCTGCGTGCACATCAGCGTACCCATACAGGTGAAAAGCCTTATAAATGCCAGAAATGCCGCAAAAGCTTTTCA  
CGTAGCGATCATCTGACCACCCATCAGCGCACACATACTGGCGAGAAACCTTACAAATGTCCAGAGTGTGGTAAATCATT  
TAGCCGTAGTGATGTTCTGGTTCGTCATCAGAGAACCACACGGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTTCAGGTGGTAGTATGG  
CTTCAGTCGAGGAATTTAGAAAACGCTCAACGTGCCAAGGGTCCGGCCACCATCCTAGCCATTGGCACAGTACCCCCGAC  
CACTGTGTCTACCAGTCTGATTATGCTGATTACTATTTCAAGGTCACTAAGAGCGAGCACATGACTGCGTTGAAGAAGAA  
GTTCAATCGCATATGTGACAAAATCCATGATCAAGAAGCGTTACATTCATTTGACCGAAGAAATGCTTGAGGAGCACCCAA  
ACATTGGTGCTTATATGGCTCCATCTCTTAACATACGCCAAGAGATTATCACTGCTGAGGTACCCAAGCTCGTAAGGAAG  
CAGCATTGAAGGCTCTTAAAGAGTGGGGTCAGCCTAAATCGAAGATCACCCACCTGTATTTGTACCACCTCAGGTGTAG  
AAATGCCTGGTGCAGATTATAAACTCGCTAATCTTTTAGCCCTCGAACCATCTGTCAGAAGAGTGATGTTGTACCATCAAG  
GGTGCTATGCAGGTGGAACGTCTCCTCGAACCGCTAAGGATCTTGCAGAGAATAATGCAGGAGCACGAGTCTTGTGGTG  
TGCTCTGAGATCACAGTTGTTACATTTCCGGCCCTTCCGAAGATGCTTTGGACTCTTTAGTTGGCCAAGCCCTTTTGGTG  
ATGGTTCTGCAGCTGTAATCGTAGGATCAGATCCGGATATCTCAATTGAACGACCCTTCCAGCTTGTCTCAGCAGCCC  
AAACATTTATTCTAATTTCTGCAGGTGCCATTCAGGAAACTTACGTGAGGTGGGACTCACCTTTCATTTGTGGCCCAATG  
TGCCACTTTAATTTCTGAGAACGTAGAGAAATGTTTACTCAGGCTTTTGACCCACTTGGTATTAGCGATTGGAACCTGT  
TATTTGGATTGCTCACCCAGGTGGCCCTGCAATCTTGTATGCAGTTGAAGCAAACTCAATTTAGATAAAAAAGAACTCG  
AAGCAACGAGGCATGTGTTAAGTGAGTATGAAAACATGTCAAGTGCATGTGTGTTTATTTGGATGAGATGAGAAAAG  
AAATCCCTTAAGGGGAGAGGGCCACCACGGTGAAGGATTGGATTGGGGAGTATTATTCGGTTTTGGACCAGGCTTGAC

TATTGAAACTGTTGTGTTGCATAGCATTCCATGGTTACAAAT **TAA** GTTTAAACCCCGGCATACGTACATATACATAGAT  
ACACACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG

Legenda:

T7 promotor

**lac** operator

**ATG** START kodon

**TAA** STOP kodon

histidinski označevalec

peptidni povezovalac

T7 terminator

ribosomsko vezavno mesto

gen za cinkov prst Zif268

gen za encim 4-kumarat:CoA ligaza (4CL)

gen za cinkov prst PBSII

gen za encim stilben sintaza (STS)

## Priloga D: Nukleotidno zaporedja programske DNA

Ena kopija programske DNA z 2 nt vmesnikom:

**GTTTGGATG****GAGCGTGGCC****GGGTGTGGAAA****TTGATGCTGCA****TTGACCACCAAGACGA**

Legenda:

**vezavno mesto za cinkov prst Blues**

**vezavno mesto za cinkov prst Zif268**

**vezavno mesto za cinkov prst PBSII**

**vezavno mesto za cinkov prst HivC**

**vezavno mesto za cinkov prst Gli1**

vmesnik

Priloga E: Podatki izvedenega  $\beta$ -galaktozidaznega testa za preverjanje učinkovitosti in specifičnosti vezave cinkovih prstov

<b>Optične gostote kultur</b>					
Zif268 0% arabinoza	Zif268 1% arabinoza	Zif268_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza	PBSII 0% arabinoza	PBSII 1% arabinoza	PBSII_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza
0,202	0,15	0,18	0,223	0,172	0,208
<b>Izmerjene maksimalne hitrosti encimske aktivnosti</b>					
Zif268 0% arabinoza	Zif268 1% arabinoza	Zif268_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza	PBSII 0% arabinoza	PBSII 1% arabinoza	PBSII_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza
247,886	28,971	440,4	341,486	165,257	542,4
239,657	27,6	460,457	577,371	143,314	679,2
297,429	28,457	449,657	350,229	127,029	621,429
<b>Izračunane Millerjeve enote</b>					
Zif268 0% arabinoza	Zif268 1% arabinoza	Zif268_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza	PBSII 0% arabinoza	PBSII 1% arabinoza	PBSII_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza
1227158,416	193140	2446666,667	1531327,354	960796,5116	2607692,308
1186420,792	184000	2558094,444	2589107,623	833220,9302	3265384,615
1472420,792	189713,3333	2498094,444	1570533,632	738540,6977	2987639,423
<b>Povprečje izračunanih Millerjevih enot</b>					
Zif268 0% arabinoza	Zif268 1% arabinoza	Zif268_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza	PBSII 0% arabinoza	PBSII 1% arabinoza	PBSII_O <sup>Tet</sup> 1% arabinoza
1295333,333	188951,1111	2500951,852	1896989,537	844186,0465	2953572,115

Priloga F: Optične gostote kultur in površine vrhov resveratrola po 6 urah inkubacije

<b>Legenda</b>	<b>Površine vrhov</b>	<b>Optične gostote kultur</b>	<b>Površina vrha/optična gostota kulture</b>
Fuzija 4CL:STS	9369	3,59	2609,7
Fuzija 4CL:STS	8022	3,72	2156,5
Fuzija 4CL:STS	8173	3,6	2270,3
Prazen vektor	114573	5,99	19127,4
Prazen vektor	117071	4,86	24088,7
Prazen vektor	132517	5,14	25781,5
2 kopiji programske DNA	127927	5,1	25083,7
2 kopiji programske DNA	160738	4,7	34199,6
2 kopiji programske DNA	149304	4,8	31105,0
4 kopije programske DNA	261383	4,6	56822,4
4 kopije programske DNA	264499	4,2	62976,0
4 kopije programske DNA	340683	4,1	83093,4
16 kopij programske DNA	181475	5	36295,0
16 kopij programske DNA	196086	4,79	40936,5
16 kopij programske DNA	189372	4,95	38257,0

<b>Legenda</b>	<b>Povprečje normaliziranih površin vrhov</b>	<b>Standardni odklon</b>
Fuzija 4CL:STS	2345,5	235,8
Prazen vektor	22999,2	3458,3
2 kopiji programske DNA	30129,4	4635,6
4 kopije programske DNA	67630,6	13740,1
16 kopij programske DNA	38496,2	2330,0