UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej TURNŠEK

SINTEZNOBIOLOŠKI PRISTOP K IZBOLJŠANJU KAROTENOIDNE BIOSINTEZNE POTI Z UPORABO CINKOVIH PRSTOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej TURNŠEK

SINTEZNOBIOLOŠKI PRISTOP K IZBOLJŠANJU KAROTENOIDNE BIOSINTEZNE POTI Z UPORABO CINKOVIH PRSTOV

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

SYNTHETIC BIOLOGY APPROACH TOWARDS IMPROVEMENT OF CAROTENOID BIOSYNTHETIC PATHWAY USING ZINC FINGERS

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2012

Knowing is not enough; we must apply. Willing is not enough; we must do.

- Goethe -

Everything you can imagine is real. - Pablo Picasso -

> Bistvo je očem nevidno. - Mali princ -

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je bil po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biotehnologije iz dne 8. 6. 2011 in na osnovi Pravilnika o diplomskem delu imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja pa prof. dr. Roman Jerala.

Recenzent: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Branka JAVORNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Član:	prof. dr. Gregor ANDERLUH Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Roman JERALA Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo
Član:	prof. dr. Nataša Poklar ULRIH Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z njeno objavo v polnem obsegu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniška fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jernej Turnšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn

DK 577.21:577.08(043.3)=163.6

KG sintezna biologija/metabolni inženiring/biosinteza/karotenoidi/likopen/β-

karoten/zeaksantin/*E. coli*/DNA ogrodja/programska DNA/DNA origami/cinkovi prsti/ prenos energije z resonanco

AV TURNŠEK, Jernej

SA ANDERLUH, Gregor (mentor)/JERALA, Roman (somentor)/POKLAR ULRIH, Nataša (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije

LI 2012

IN SINTEZNOBIOLOŠKI PRISTOP K IZBOLJŠANJU KAROTENOIDNE BIOSINTEZNE POTI Z UPORABO CINKOVIH PRSTOV

- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XXII, 124 str., 34 pregl., 94 sl., 10 pril., 206 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI V naravi je optimizacija številnih metabolnih procesov posledica organizacije encimov v multiencimske komplekse. Po njenem zgledu smo v diplomskem delu predstavili sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Za dokaz principa delovanja takšnih sintetičnih bioloških sistemov smo najprej pripravili plazmidne vektorje z geni za fuzijske proteine med cepljenimi fluorescenčnimi proteini in DNA vezavnimi domenami iz cinkovih prstov. Po transfekciji le-teh skupaj s plazmidnim vektorjem s programsko DNA smo v jedrih HEK293 celic zaznali od programske DNA odvisno rekonstitucijo cepljenih fluorescenčnih proteinov mCerulean in mCitrine ter prenos energije z resonanco fluorescence (FRET) med njima. Okarakterizirali smo še dva proteina za funkcionalizacijo DNA origamija, ki razširja pojem DNA ogrodij v 2 oz. 3 dimenzije in bi lahko v prihodnje imel pomembno vlogo na področju inženiringa biosinteznih poti. Končno smo pripravili plazmidne vektorje z geni za fuzijske proteine med encimi karotenoidne biosintezne poti in DNA vezavnimi domenami iz cinkovih prstov ter plazmidne vektorje s programsko DNA, zaporedjem vezalnih mest, kamor se takšni fuzijski proteini lahko vežejo. Kopičenje encimov na DNA ogrodju je v E. coli vodilo v 4-kratno oziroma 3,5-kratno izboljšanje produkcije likopena in β-karotena. Predstavljena biomimetična strategija znotrajcelične prostorske organizacije heterolognih encimov je komplementarna z že uveljavljenimi pristopi metabolnega inženiringa za izboljševanje (komercialno zanimivih) biosinteznih poti.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn

DC 577.21:577.08(043.3)=163.6

CX synthetic biology/metabolic engineering/biosynthesis/carotenoids/lycopene/β-

carotene/zeaxanthin/*E*. *coli*/DNA scaffolds/program DNA/DNA origami/zinc fingers/ resonance energy transfer

AU TURNŠEK, Jernej

AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/JERALA, Roman (co-supervisor)/POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology

PY 2012

TI SYNTHETIC BIOLOGY APPROACH TOWARDS IMPROVEMENT OF CAROTENOID BIOSYNTHETIC PATHWAY USING ZINC FINGERS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XXII, 124 p., 34 tab., 94 fig., 10 ann., 206 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Many metabolic processes in nature are optimised via enzyme organisation into multienzyme complexes. Inspired by nature we have devised a synthetic biology approach towards improvement of carotenoid biosynthetic pathway using zinc fingers. In order to prove the underlying concept of such synthetic biological systems, we have first constructed plasmid vectors with genes encoding fusion proteins comprised of split fluorescent proteins and zinc finger DNA binding domains. After transfecting them along with the plasmid vector carrying program DNA, we have observed program DNAdependent reconstitution of split fluorescent proteins mCerulean and mCitrine in HEK293 cells' nuclei as well as fluorescence resonance energy transfer (FRET) between them. In addition, we have characterized two fusion proteins for functionalizing DNA origami, which expands DNA scaffolds in 2 and 3 dimensions and might have an important role in the future when it comes to biosynthetic pathway engineering. Finally, we have constructed plasmid vectors with genes encoding fusion proteins comprised of carotenoid biosynthetic pathway enzymes and zinc finger DNA binding domains as well as plasmid vectors carrying a rationally designed program DNA, a sequence of DNA binding sites, which serve to anchor such fusion proteins. DNA scaffold-assisted clustering of enzymes in E. coli has led to 4-fold and 3,5-fold increase in lycopene and β-carotene production, respectively. The presented biomimetic strategy for intracelullar spatial organisation of heterologous enzymes offers a complementary route to the already established metabolic engineering approaches for improving (commercially appealing) biosynthetic pathways.

KAZALO VSEBINE

			str.
K	LJUČNA DO	KUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
K	EY WORDS I	DOCUMENTATION (KWD)	IV
K	AZALO VSEI	BINE	V
K	AZALO PRE	GLEDNIC	X
K	AZALO SLIK	-	XI
K	AZALO PRII	.OG	XIV
0	KRAJŠAVE I	N SIMBOLI	XV
SI	LOVARČEK.		XX
1	UVOD		1
	1.1 OPR	EDELITEV PROBLEMA	2
	1.2 CILJ	I DIPLOMSKEGA DELA	
	1.3 DEL	OVNE HIPOTEZE	
2	PREGLE	D OBJAV	4
	2.1 PRO	STORSKA ORGANIZACIJA ENCIMOV	4
	2.1.1 N	aravni (multi)encimski kompleksi	
	2.1.1.1	Bakterijski mikrorazdelki	4
	2.1.1.2	Lumazin sintazni kompleks	5
	2.1.1.3	Enkapsulini	5
	2.1.1.4	Encimi z metabolnimi tuneli	6
	2.1.1	.4.1 Triptofan sintaza	6
	2.1.1	.4.2 Karbamoil fosfat sintetaza (CPS)	6
	2.1.1	.4.3 Dihidrofolat reduktaza-timidilat sintaza (DHFR-TS)	7
	2.1.1.5	MAP kinazna signalna pot v S. cerevisiae	7
	2.1.1.6	Multiencimski kompleksi v biosinteznih poteh	7
	2.1.1	.6.1 Biosinteza durina	7
	2.1.1	.6.2 Biosinteza šikimata	
	2.1.1	.6.3 Biosinteza poliketidov	
	2.1.1	.6.4 Celulosomi	9
	2.1.1	.6.5 Purinosom	
	2.1.2 Si	nteznobiološki pristopi k prostorski organizaciji encimov	
	2.1.2.1	Fuzijski encimi	11
	2.1.2.2	Sintetična ogrodja za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov	
	2.1.2	.2.1 Proteinska ogrodja	11
	2.1.2	.2.2 RNA ogrodja	
	2.1.2	.2.3 DNA ogrodja	
	2.	1.2.2.3.1 Programska DNA	
	2.	1.2.2.3.2 DNA origami	
	2.2 DNA	VEZAVNE DOMENE	
	2.2.1 C	inkovi prsti	
	2.2.1.1	Udkritje	
	2.2.1.2	Strukturna razvrstitev cinkovih prstov	
	2.2.1.3	Woreve Cus2 His2 cinkovih protov na DNA	
	2.2.1.4	vezava Uys2-HIS2 cinkovin prstov na DNA	
	2.2.1.3	wietoue nacitovanja cinkovni pistov z novimi specificnostmi	

	2.2	.1.5.1 Fagna predstavitev	20
	2.2	.1.5.2 Bakterijski dvohibridni sistem (B2H)	20
	2.2	.1.5.3 Modularno sestavljanje	21
	2.2	.1.5.4 Od selekcije neodvisno načrtovanje cinkovih prstov – CoDA	22
	2.2.1.6	5 Zaznavanje bližine vezave na DNA s cepljenimi proteini	23
	2.2.1.7	7 Vezava cinkovih prstov na DNA origami	24
	2.2.1.8	3 Izbor DNA vezavnih domen iz cinkovih prstov	24
	2.2	.1.8.1 Spletne baze cinkovih prstov	24
	2.2	.1.8.2 Domene vključene v diplomsko delo	24
	2.2.2	TAL efektorji	25
	2.3 PR	ENOS ENERGIJE Z RESONANCO (RET)	26
	2.3.1	Osnovni fotofizikalni pojmi	26
	2.3.2	Prenos energije z resonanco fluorescence (FRET)	27
	2.3.2.1	<i>in vivo</i> FRET biosenzor za cink	28
	2.3.3	Prenos energije z resonanco bioluminiscence (BRET)	29
	2.4 KA	ROTENOIDNA BIOSINTEZNA POT	30
	2.4.1	Naravne vloge karotenoidov in njihova razdelitev	30
	2.4.2	Pomen karotenoidov za zdravje človeka	30
	2.4.3	Biosinteza karotenoidov v E. coli	31
	2.4.4	Metabolni inženiring heterologne mikrobne produkcije karotenoidov	33
	2.4.5	Ekonomski pomen karotenoidov	34
3	MATER	IALI IN METODE	35
	3.1 MA	ATERIALI	35
	3.1.1	Laboratorijska oprema	35
	3.1.2	Kemikalije	37
	3.1.3	Raztopine in pufri	
	3.1.4		41
	3141	nSB1AK3	<u>41</u>
	3140	2 pSB1AK8 s CMV promotoriem	42
	3.1.4 3	s pSB1K1. s chrv pronotorjon	42
	3.1.4.4	pSB1C3	43
	3.1.4.4	5 pSB4C5	43
	3.1.4.6	5 pET-41a(+)	44
	3.1.4.7	7 mCerulean-C1	44
	3.1.5	Restrikcijski encimi	45
	3.1.6	Protitelesa	45
	3.1.7	Organizmi	46
	3.1.7.1	Bakterijski sevi	46
	3.1.7.2	2 Celične kulture	46
	3.1.8	Gojišča	46
	3.2 ME	TODE	46
	3.2.1	Priprava gojišč	46
	3.2.1.1	Bakterijska gojišča	46
	3.2.1.2	2 Gojišče za celične kulture	47
	3.2.2	Sterilizacija steklovine, gojišč, raztopin in pufrov	47
	3.2.3	Osnovne metode molekulskega kloniranja	47
	2721	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	47
	5.2.5.1		••• • • /

3232 AG	arozna gelska elektroforeza	49
3233 Či	ččenje DNA iz agaroznega gela	
3231 Re	strikojia DNA	رب ۱۹
3.2.3.4 RC	ilagania oligonuklaotidov	
2.2.3.5 FI		50
3.2.3.0 Li	gacija	50
3.2.3.7 PI	prava kompetentini cene	30
3.2.3.8 If		50
3.2.3.9 Izo	Diacija plazmidne DNA	51
3.2.3.10	Dolocanje koncentracije DNA	51
3.2.3.11	Določanje nukleotidnega zaporedja	51
3.2.3.12	Kloniranje po sistemu BioKock	51
3.2.4 Delo s	celično kulturo HEK293	52
3.2.4.1 Go	jenje celične kulture	52
3.2.4.2 Pr	ehodna transfekcija pritrjenih celic	52
3.2.5 Lasers	ka konfokalna mikroskopija (LCSM)	53
3.2.5.1 Fil	ksacija celic s paraformaldehidom	53
3.2.5.2 Ba	rvanje celičnih jeder z barvilom Hoechst 34580	54
3.2.5.3 Me	erjenje FRET-a z metodo bledenja akceptorja	54
3.2.5.3.1	Teoretično ozadje metode	54
3.2.5.3.2	Izvedba meritev	54
3.2.5.3.3	Statistična obdelava meritev	55
3.2.6 Metod	e dela z rekombinantnimi proteini	55
3261 Pr	odukcija rekombinantnih proteinov	55
32611	Transformacija in vcenljanje kultur v produkcijska gojišča	55
32612	Sestava produkcijskaga gojišča	55
3 2 6 1 3	Indukcija izražanja z IPTC in onis delovanja pET sistema	55
3.2.0.1.3	Žatio in lizo golio	55
3.2.0.1.4	Zetje in iza cene	50
3.2.0.1.5	Razbijanje cenc z utrazvokom	30
3.2.6.1.6		56
3.2.6.2 00	ena izrazanja rekombinantnih proteinov	57
3.2.6.2.1	Vlivanje SDS-PAGE gelov	57
3.2.6.2.2	Priprava vzorcev za SDS-PAGE	57
3.2.6.2.3	SDS-PAGE	58
3.2.6.2.4	Barvanje proteinov z barvilom Commassie modrim	58
3.2.6.2.5	Western prenos	58
3.2.6.3 Ni	-NTA kelatna kromatografija za izolacijo proteinov pod nativnimi pogoji	59
3.2.6.3.1	Priprava kolone	60
3.2.6.3.2	Spiranje in elucija	60
3.2.6.3.3	Dializa	61
3.2.6.3.4	Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov z merjenjem A280	62
3.2.6.4 Ka	rakterizacija fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	62
3.2.6.4.1	Cirkularni dikroizem (CD)	62
3.2.6.4.2	Ocena deležev α-vijačnic in β-struktur s programom K2d	64
3.2.6.4.3	Določanje hidrodinamskega radija proteina z DLS	64
3.2.6.4.4	Merjenje fluorescence	64
3.2.6.4.5	Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA)	64
3.2.6.4.6	Kvalitativni test z UV lučjo	66
3.2.6.5 Ka	rakterizacija fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis	66

3.2.6.5.1 Luciferazni test	
3.2.6.5.2 Kvalitativni test z G:BOX	
3.2.7 Metode dela s karotenoidi	
3.2.7.1 Mikrobna produkcija likopena, β-karotena in zeaksantina	
3.2.7.2 Ekstrakcija karotenoidov iz celic	
3.2.7.3 Analitske metode za določitev identitete spojin	
3.2.7.3.1 Spektrofotometrija	
3.2.7.3.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	
3.2.7.3.2.1 Obdelava HPLC meritev	
4 REZULTATI	
4.1 ZAZNAVANJE FRET-A NA PROGRAMSKI DNA	
4.1.1 Priprava DNA konstruktov	
4.1.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov	
4.1.1.2 Kontrolne restrikcije	
4.1.1.3 Shema sistema	
4.1.1.4 Rezultati konfokalne mikroskopije	
4.1.1.4.1 Transfekcija	
4.1.1.4.2 Izražanje in lokalizacija proteinov	
4.1.1.4.3 Meritve učinkovitosti FRET-a	
4.1.1.4.4 Statistična obdelava meritev	
4.2 PRIPRAVA PROTEINOV ZA FUNKCIONALIZACIJO DNA ORIGAN	/IIJA 75
4.2.1 Priprava DNA konstruktov	
4.2.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov	
4.2.1.2 Kontrolne restrikcije	
4.2.1.3 Shema sistema	
4.2.2 Produkcija in izolacija proteinov	
4.2.3 Karakterizacija fuzijskih proteinov	
4.2.3.1 Fuzijski protein MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	
4.2.3.1.1 Cirkularni dikroizem in ocena deležev α -vijačnic in β -struktur	r79
4.2.3.1.2 Ocena hidrodinamskega radija proteina z DLS	
4.2.3.1.3 Fluorescenčni spekter	
4.2.3.1.4 Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA)	
4.2.3.1.5 Kvalitativni test z UV lučjo	
4.2.3.2 Fuzijski protein MBP-RLuc-2C7-8xHis	
4.2.3.2.1 Luciferazni test	
4.2.3.2.2 Kvalitativni test z G:BOX	
4.3 PRODUKCIJA KAROTENOIDOV OB PRISOTNOSTI PROGRAMSK	E DNA 83
4.3.1 Priprava DNA konstruktov	
4.3.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov	
4.3.1.1.1 Programska DNA	
4.3.1.1.2 Operoni za biosintezo karotenoidov	
4.3.1.1.2.1 Mehanizem delovanja pBAD promotorja	
4.3.1.2 Kontrolne restrikcije	
4.3.1.2.1 Programska DNA	
4.3.1.2.2 Operoni za biosintezo karotenoidov	
4.5.2 Ocena aktivnosti operonov za biosintezo karotenoidov	
4.3.2.1 Obarvanost produkcijskih kultur, peletiranih celic in ekstraktov	
4.3.2.2 Spektrofotometrična analiza ekstraktov	

4.3.3.1Biosinteza likopena894.3.3.2Biosinteza β -karotena904.3.3.3Biosinteza β -karotena914.3.4Kemijska analiza karotenoidov s HPLC924.3.4.1Likopen924.3.4.2 β -karoten934.3.4.3Zeaksantin935RAZPRAVA IN SKLEPI945.1RAZPRAVA945.1.1Zaznavanje FRET-a na programski DNA945.1.1Razlike v izražanju proteinov945.1.1.2Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA945.1.1.3Problemi uporabljenih DiCP955.1.1.4Dolžina programske DNA965.1.2Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija965.1.2.1Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP965.1.3.1Izbor biosintezne poti975.1.3Izbor biosintezne poti975.1.3.1Izbor DNA vezavnih domen975.1.3.4Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov985.1.3.4Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov985.1.3.5Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov985.1.3.6Izbor biosintezne poti985.1.3.7Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programskiDNA0015.1.3.8Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko005.1.3.7Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na		4.3.3	Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA	89
4.3.3.2 Biosinteza β-karotena 90 4.3.3.3 Biosinteza zeaksantina 91 4.3.4 Kemijska analiza karotenoidov s HPLC 92 4.3.4.1 Likopen 92 4.3.4.2 β-karoten 93 4.3.4.3 Zeaksantin 93 5.1 RAZPRAVA IN SKLEPI 94 5.1.1 Razlike v izražanju proteinov 94 5.1.1 Razlike v izražanju proteinov 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.2 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Priprava proteinov va funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Priprava proteinov va funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.1 Izbor biosintezne poti 98 <		4.3.3.	1 Biosinteza likopena	89
4.3.3.3 Biosinteza zeaksantina 91 4.3.4 Kemijska analiza karotenoidov s HPLC 92 4.3.4.1 Likopen 92 4.3.4.2 β-karoten 93 4.3.4.3 Zeaksantin 93 5 RAZPRAVA IN SKLEPI 94 5.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origanija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih pristontost programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih priston va delovanje encimov 98 5.1.3.4		4.3.3.	2 Biosinteza β-karotena	90
4.3.4 Kemijska analiza karotenoidov s HPLC 92 4.3.4.1 Likopen 92 4.3.4.2 β-karoten 93 4.3.4.3 Zeaksantin 93 5 RAZPRAVA IN SKLEPI 94 5.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 Razlike v izražanju proteinov 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.1 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 9		4.3.3.	3 Biosinteza zeaksantina	91
4.3.4.1 Likopen 92 4.3.4.2 \$\mathcal{B}\mathcal{A}\mathcal{B}\mathcal\mathcal{B}\mathcal		4.3.4	Kemijska analiza karotenoidov s HPLC	92
4.3.4.2 β-karoten 93 4.3.4.3 Zeaksantin 93 5 RAZPRAVA IN SKLEPI 94 5.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA 94 5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžne vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov i		4.3.4.	1 Likopen	92
4.3.4.3 Zeaksantin		4.3.4.	2 β-karoten	93
5 RAZPRAVA IN SKLEPI		4.3.4.	3 Zeaksantin	93
5.1 RAZPRAVA 94 5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA 94 5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA 94 5.1.1.1 Razlike v izražanju proteinov 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor promotorja in produkcijakega organizma 99 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99	5	RAZPR	AVA IN SKLEPI	94
5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA		5.1 RA	ZPRAVA	94
5.1.1.1 Razlike v izražanju proteinov 94 5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 100 5.3 POGLED V P		5.1.1	Zaznavanje FRET-a na programski DNA	94
5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA 94 5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP 95 5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 <		5.1.1.	1 Razlike v izražanju proteinov	94
5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP		5.1.1.	2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA	94
5.1.1.4 Dolžina programske DNA 96 5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a 96 5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101		5.1.1.	3 Problemi uporabljenih DiCP	95
5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a		5.1.1.4	4 Dolžina programske DNA	96
5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija 96 5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.1.	5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a	96
5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP 96 5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski DNA 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.2	Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija	96
5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov 97 5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.2.	1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP	96
5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA 97 5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107		5.1.2.	2 Karakterizacija fuzijskih proteinov	97
5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen 97 5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3	Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA	97
5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov 98 5.1.3.3 Izbor biosintezne poti 98 5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3.	1 Izbor DNA vezavnih domen	97
5.1.3.3 Izbor biosintezne poti		5.1.3.	2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov	98
5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov 98 5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 90 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3.	3 Izbor biosintezne poti	98
5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika 99 5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3.4	4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov	98
5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma 99 5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski DNA 100 5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov 101 5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3.	5 Vpliv dolžine vmesnika	99
5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski DNA		5.1.3.	6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma	99
5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov		5.1.3. [•] DNA.	7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski	. 100
5.2 SKLEPI 102 5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.1.3. usmer	8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko jeno kopičenje encimov	. 101
5.3 POGLED V PRIHODNOST 103 6 POVZETEK 105 7 VIRI 107 ZAHVALA 107		5.2 SK	LEPI	. 102
6 POVZETEK		5.3 PC	GLED V PRIHODNOST	. 103
7 VIRI	6	POVZE	ГЕК	. 105
ZAHVALA	7	VIRI		. 107
	Ż	AHVALA		• 107

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Strukturna razvrstitev cinkovih prstov in njihove funkcije (povzeto po Sri Krishna in 2003)	sod.,
Preglednica 2: DiCP uporabliene v diplomskem delu.	25
Preglednica 3: Fluorescenčna proteina za FRET uporabliena v diplomskem delu.	28
Preglednica 4: Biološke vloge, koristi za zdravje in uporaba pomembnejših karotenoidov (Vílchez in	sod.,
2011: 324).	30
Preglednica 5: Encimi karotenoidne biosintezne poti uporabljeni v diplomskem delu	32
Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema z navedbo proizvajalca	35
Preglednica 7: Uporabljene kemikalije z navedbo proizvajalca	37
Preglednica 8: Pufri za pripravo kompetentnih celic.	38
Preglednica 9: Pufri in raztopine za delo z DNA.	39
Preglednica 10: Pufri in raztopine za delo s celičnimi kulturami	39
Preglednica 11: Raztopine za pripravo celic za mikroskopiranje s konfokalnim mikroskopom	39
Preglednica 12: Pufri in raztopine za delo s proteini.	39
Preglednica 13: Pufer za test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA)	40
Preglednica 14: Pufer za testiranje aktivnosti fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis	40
Preglednica 15: Raztopine za eksperimente z biosintezo karotenoidov	40
Preglednica 16: Uporabljeni plazmidi	41
Preglednica 17: Uporabljeni restrikcijski encimi.	45
Preglednica 18: Uporabljena protitelesa.	45
Preglednica 19: Uporabljeni bakterijski sevi E. coli.	46
Preglednica 20: Uporabljene celične kulture.	46
Preglednica 21: Sestava LB gojišča	46
Preglednica 22: Sestava 2x YT gojišča z dodano glukozo in ZnCl ₂	47
Preglednica 23: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo AccuPrime TM Pfx	48
Preglednica 24: Temperaturni profil verižne reakcije z DNA polimerazo AccuPrime TM <i>Pfx</i>	48
Preglednica 25: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo Phusion [®] High-Fid	lelity
(HF)	48
Preglednica 26: Temperaturni profil verižne reakcije z DNA polimerazo Phusion [®] High-Fidelity (HF)	48
Preglednica 27: Sestava 10 % ločitvenega SDS-PAGE gela (za 2 gela).	57
Preglednica 28: Sestava 4 % vstopnega SDS-PAGE gela (za 2 gela)	57
Preglednica 29: Lastnosti obeh fuzijskih proteinov na osnovi analize s spletnim orodjem ProtParam	60
Preglednica 30: Vezalni oligonukleotidi uporabljeni za test zamika elektroforezne mobilnosti.	65
Preglednica 31: Koncentraciji fuzijskih proteinov po dializi.	78
Preglednica 32: Teoretične in eksperimentalne vrednosti deležev sekundarnih struktur v fuzijskem prot MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis.	teinu 79
Preglednica 33: Vrednosti meritev bioluminscence supernatanta proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis	82
Preglednica 34: Izoelektrične točke proteinov za FRET na programski DNA.	95

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Analogija računalništva z življenjem kot ga vidi sintezni biolog (Galitski, 2012: 1)
Slika 2: (a) Pretvorba sladkorjev v uporabne spojine z mikrobno katalizo (Keasling, 2010: 1355). (b) Primer
umetne biosintezne poti (Horinouchi, 2008: 709).
Slika 3: Prostorska organizacija encimov vodi v optimizacijo biosinteznih poti (Lee in sod, 2011) 2
Slika 4: Struktura plašča bakterijskih mikrorazdelkov (Yeates in sod., 2011: 225)
Slika 5: (a) Karboksisom (Kerfeld in sod., 2010: 259). (b) Pdu metabolosom (Bobik, 2006: 520). (c) Eut metabolosom (Heldt in sod., 2009: 200)
Slika 6: $\alpha_2\beta_2$ kompleks triptofan sintaze iz bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> (Hyde in sod., 1988: 17860) 6
Slika 7: Mehanizem delovanja in struktura karbamoil fosfat sintetaze (Thoden in sod., 2004: 2399)
Slika 8: Prostorsko urejanje signalnih poti (Good in sod., 2011: 680, 683)
Slika 9: Biosinteza durina poteče znotraj multiencimskega kompleksa (Conrado in sod., 2009: 493)
Slika 10: AROM kompleks (Weeks in Chang, 2011: 5411)
Slika 11: Modularna organizacija biosinteze poliketidov (Khosla in sod., 2009: 136)
Slika 12: Shema supramolekularne strukture tipičnega celulosoma (Bayer in sod., 2004: C-1)
Slika 13: Od aktivacije GPCR do mitoze (Mohr in Kostenis, 2011: 860)
Slika 14: Biosintezni tekoči trak na proteinskem ogrodju (DeLisa in Conrado, 2009: 728) 12
Slika 15: Načrtovanje RNA ogrodij za prostorsko organizacijo proteinov (Delebecque in sod., 2011) 12
Slika 16: Biosinteza resveratrola na programski DNA (Conrado in sod., 2012: 1883)
Slika 17: Tehnika DNA origami (Samoza, 2009: 9406)
Slika 18: 3D DNA origami v obliki škatle s pokrovom (Andersen in sod., 2009: 75),
Slika 19: Z DNA origamijem posredovana kolokalizacija encimov (Fu in sod., 2012: 5516),
Slika 20: Raznolikost DNA vezavnih motivov (Shrivastava in Tahirov, 2010: 48)
Slika 21: Interakcija TFIIIA z DNA (Miller in sod., 1985: 1613).
Slika 22: Strukturna razvrstitev cinkovih prstov (Sri Krishna in sod. 2003: 534)
Slika 23: Struktura Cys2-His2 cinkoyega prsta (Braver in Segal 2008: 112)
Slika 24: (a) Mestnospecifična interakcija cinkovega prsta z DNA (Segal in sod 2003: 2138) (b) Kompleks
Zif268 z DNA (Elrod-Erickson in sod., 1996: 1172)
Slika 25: (a) Osnovni princip presejanja fagne knjižnice (Bratkovič, 2010: 750). (b) Izbor cinkovih prstov s fagno predstavitvijo (Choo in Klug, 1995: 431)
Slika 26: (a) B2H selekcija cinkovih prstov s kvasnim <i>his3</i> (Joung in sod., 2000: 7385). (b) B2H selekcija cinkovih prstov z β -galaktozidazo (Ramirez in sod., dodatek, 2008: 5)
Slika 27: Shema metode modularnega sestavljanja DiCP (Ramirez in sod., dodatek, 2008: 4)
Slika 28: Shema načrtovanja DiCP po sistemu CoDA (Sander in sod., 2011: 68)
Slika 29: Princip zaznavanja bližine vezave na DNA s cepljenimi proteini (Furman in sod., 2009: 3748) 23
Slika 30: Vezava DiCP na DNA origami (Nakata in sod., 2012: s15)
Slika 31: (a) Bakterije, ki izražajo različne fluorescenčne proteine (Tsien, 2009: 5624). (b) Bioluminiscenčna
gliva (Ylem, 2009)
Slika 32: Prekrivanje spektrov CFP in YFP (Piston in Kramers, 2007: 408)
Slika 33: Shema cinkovega biosenzorja (Qiao in sod., 2006: 8675)
Slika 34: FRET in BRET za zaznavanje proteinskih interakcij (Hong in sod., 2012: 288)
Slika 35: Biosinteza karotenoidov v E. coli (Das in sod., 2007)
Slika 36: Heterologni del karotenoidne biosintezne poti v E. coli s strukturami metabolitov
Slika 37: Uporabljeni velikostni standardi za elektroforeze
Slika 38: Plazmidni vektor pSB1AK3

Slika 39: Plazmidni vektor pSB1AK8 s CMV promotorjem.	. 42
Slika 40: Plazmidni vektor pSB1K3	. 42
Slika 41: Plazmidni vektor pSB1C3.	. 43
Slika 42: Plazmidni vektor pSB4C5.	. 43
Slika 43: Plazmidni vektor pET41a(+).	. 44
Slika 44: Plazmidni vektor mCerulean-C1.	. 44
Slika 45: Tritočkovna ligacija po sistemu BioKock (Shetty in sod., 2008: 5).	. 52
Slika 46: pET sistem za čezmerno izražanje rekombinantnih proteinov (pET System, 2006)	. 56
Slika 47: Interakcije pri izolaciji proteina z Ni-NTA kelatno kromatografijo (Knecht in sod., 2009: 277).	. 61
Slika 48: Značilni CD spektri sekundarnih struktur proteina	. 63
Slika 49: Tipi vezalnih oligonukleotidov	. 65
Slika 50: Napoved sekundarnih struktur vezalnih oligonukleotidov.	. 65
Slika 51: Kontrolni plazmidi za FRET eksperimente.	. 68
Slika 52: Plazmidi s cepljenimi fluorescenčnimi proteini	. 69
Slika 53: Plazmid s programsko DNA za zaznavanje FRET-a v sesalskih celicah	. 69
Slika 54: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih pri FRET eksperimentih	. 70
Slika 55: Dokaz hkratne vezave DiCP na programsko DNA s FRET-om.	. 70
Slika 56: Transfekcija celic HEK293 za zaznavanje FRET-a na programski DNA	. 71
Slika 57: Razlike v izražanju cepljenih fluorescenčnih proteinov	. 72
Slika 58: Kolokalizacija fuzijskih proteinov za zaznavanje FRET-a na programski DNA	. 72
Slika 59: Primer izvedbe zaznavanja FRET-a z metodo bledenja akceptorja	. 73
Slika 60: Učinkovitost FRET-a	. 73
Slika 61: DNA konstrukta fuzijskih proteinov za BRET na DNA origamiju	. 75
Slika 62: Kontrolni restrikciji DNA konstruktov fuzijskih proteinov za BRET na DNA origamiju	. 75
Slika 63: Funkcionalizacija DNA origamija z BRET partnerjema.	. 76
Slika 64: Prisotnost fuzijskih proteinov brez domene za izboljšano topnost v netopni obliki	. 76
Slika 65: Produkcija in izolacija fuzijskih proteinov za funkcionalizacija DNA origamija z BRET-om	. 78
Slika 66: Povprečna molarna eliptičnost podana na AK ostanek v fuzijskem proteinu MBP-mCitr AZPA4-8xHis.	ine- 79
Slika 67: Ocena hidrodinamskega radija fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	80
Slika 68: Emisijski spekter supernatanta fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	. 80
Slika 69: EMSA z MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in vsemi tipi vezalnih oligonukleotidov za vezavo prote na DNA origami.	eina 81
Slika 70: Ocena funkcionalnosti proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis.	82
Slika 71: Rezultat luciferaznega testa s supernatantom proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis	82
Slika 72: Ocena funkcionalnosti proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis.	. 83
Slika 73: Plazmidi s programsko DNA	84
Slika 74: Kontrolni plazmid brez programske DNA	. 85
Slika 75: Operoni za biosintezo karotenoidov likopena, β-karotena in zeaksantina	. 86
Slika 76: Shema mehanizma delovanja pBAD promotorja (Sørensen in Mortensen, 2005a: 116).	. 86
Slika 77: Kontrolne restrikcije plazmidov s programsko DNA.	. 87
Slika 78: Kontrolne restrikcije plazmidov z operoni za biosintezo karotenoidov	. 87
Slika 79: Obarvanost produkcijskih kultur, peletiranih celic in ekstraktov.	. 88
Slika 80: Značilni absorpcijski spektri likopena, β-karotena in zeaksantina.	. 89
Slika 81: Shema biosinteze likopena ob prisotnosti programske DNA.	. 89

Slika 82: Produkcija likopena ob prisotnosti programske DNA.	90
Slika 83: Shema biosinteze β-karotena ob prisotnosti programske DNA.	90
Slika 84: Produkcija β-karotena ob prisotnosti programske DNA	91
Slika 85: Shema biosinteze zeaksantina ob prisotnosti programske DNA.	92
Slika 86: HPLC kromatogram ekstrakta likopena.	92
Slika 87: HPLC kromatogram ekstrakta β-karotena.	93
Slika 88: HPLC kromatogram ekstrakta zeaksantina	93
Slika 89: Odvisnost učinkovitosti FRET-a od razdalje med fluoroforoma (Piston in Kremers, 2007: 408	3) 96
Slika 90: Vpliv dolžine vmesnika na arhitekturo vezave fuzijskih proteinov.	99
Slika 91: Slabost kopičenja proteinov na sintetičnih ogrodjih (Good in sod., 2011).	100
Slika 92: DNA nanostrukture kot biomimetični sistemi in vivo (Pinheiro in sod., 2011: 5)	103
Slika 93: Organizacija večencimskih kaskad z DNA origamijem (Simmel, 2012: 4)	103
Slika 94: Grafični povzetek diplomskega dela.	106

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Oligonukleotidi za kloniranje programske DNA

PRILOGA B: Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a

PRILOGA C: Aminokislinski zaporedji fuzijskih proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija

PRILOGA D: Nepretvorjene povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis

PRILOGA E: Pretvorjene povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis

PRILOGA F: Pretvorjenje povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis po glajenju in premiku krivulje

PRILOGA G: Deleži sekundarnih struktur v PDB modelih za teoretično napoved sekundarne strukture fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis

PRILOGA H: Optimizacija ekstrakcije karotenoidov

PRILOGA I: Umeritvene krivulje in normalizacija koncentracij karotenoidov na OD₆₀₀

PRILOGA J: Pozitivna povratna zanka, ki vodi v delovanje pBAD promotorja po principu vse ali nič

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

∞	Neskončno
% (v/v)	Volumski odstotek
% (w/v)	Masno-volumski odstotek
1,2-PD	1,2-propandiol
2D	Dvorazsežen, dvodimenzionalen
2x YT	2x kvasni tripton (ang. »Yeast Tryptone«)
3D	Trirazsežen, tridimenzionalen
3	(Molarni) ekstinkcijski koeficient
γ	Masna koncentracija
λ_{ex}	Valovna dolžina ekscitacije
θ_{MRE}	Povprečna molarna eliptičnost podana na aminokislinski ostanek
Å, å	Angstrem (0,1 nm)
A ₂₃₀	Absorbanca pri valovni dolžini 230 nm
A ₂₆₀	Absorbanca pri valovni dolžini 260 nm
A ₂₈₀	Absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
Abs _{0,1%}	Absorbanca proteina pri 280 nm, če bi ga imeli v koncentraciji 1 mg/ml
AK	Aminokislina
Amp ^r	Odpornost proti ampicilinu
ang.	Angleško
APS	Amonijev persulfat
AraC	Regulator (represor in aktivator) pBAD promotorja
AraE	Transporter za arabinozo
ATCC	ang. »American Type Culture Collection«
B2H	Bakterijski dvohibridni sistem
BIOMOD	ang. »BIOMOlecular Design«
bp	Bazni par
BRET	Prenos energije z resonanco bioluminiscence
BSA	Goveji serumski albumin

с	Množinska koncentracija/molarnost
Ccdb	Toksin, ki z inhibicijo encima DNA giraze prepreči podvajanje DNA
CD	Cirkularni dikroizem
CDTA	1,2-cikloheksilen-dinitrilo-tetraocetna kislina
Cm ^r	Odpornost proti kloramfenikolu
CoDA	ang. »Context-Dependent Assembly«
cP	Centipoise
CPS	Karbamoil fosfat sintetaza
CrtB	Fitoen sintaza
CrtE	GGPP sintaza
CrtI	Fitoen desaturaza
CrtO	β-karoten ketolaza
CrtW	β-karoten ketolaza
CrtY	Likopen β-ciklaza
CrtZ	β-karoten hidroksilaza
Cys	Cistein
Da	Atomska masna enota/dalton ($\approx 1,66 \ge 10^{-27} \text{ kg}$)
DHFR-TS	Dihidrofolat reduktaza-timidilat sintaza
DiCP	Domena iz cinkovih prstov
DLS	Dinamično sipanje svetlobe (ang. »Dynamic Light Scattering«)
DMEM	Gojišče za celične kulture (ang. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Deoksiribonukleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DOC	Deoksiholat
D _{post}	Fluorescenca donorja po bledenju akceptorja
D _{pre}	Fluorescenca donorja pred bledenjem akceptorja
dsDNA	Dvoverižna DNA
DTT	Ditiotreitol
E. coli	Escherichia coli

ECL	Ojačana kemiluminiscenca	
EDTA	Etilen-diamin-tetraocetna kislina	
EMSA	Test zamika elektroforezne mobilnosti (ang. »Electrophoretic Mobility Shift Assay«)	
FBS	Fetusni serum goveda	
FP	Fluorescenčni protein	
FPP	Farnezil pirofosfat	
FRET	Prenos energije z resonanco fluorescence	
FRET _{eff}	Učinkovitost FRET-a	
GGPP	Geranilgeranil pirofosfat	
GnHCl	Gvanidinijev hidroklorid	
GPCR	Z G-proteinom sklopljeni receptor	
GST	Glutation S-transferaza	
H ₀	Ničelna domneva	
H _A	Alternativna domneva	
HEK293	Trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic	
His	Histidin	
HIV	Humani imunodeficientni virus	
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločjivosti	
HRP	Hrenova peroksidaza	
iGEM	ang. »international Genetically Engineered Machines«	
IPTG	Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid	
K2d	Spletni program za analizo sekundarne strukture proteinov na podlagi CD spektra	
Kan ^r	Odpornost proti kanamicinu	
kbp	Kilobazni par	
kDa	Kilodalton	
k _{cat}	Pretvorbeno število (merilo katalitske učinkovitosti encima)	
K _M	Michaelis-Mentenova konstanta	
LB	Luria-Bertani gojišče	
LCSM	Laserska konfokalna mikroskopija	

m	Monomeren (npr. v mCerulean – m pomeni, da protein ne oligomerizira)
mA	Miliamper
MAP	Z mitogenom aktivirani protein
MBP	Maltoza vezalni protein
MEP	Nemevalonatna biosintezna pot
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonska kislina
mRNA	Informacijska RNA
MRW	Povprečna molska masa aminokislinskega ostanka v proteinu (ang. »Mean Residue Weight«)
MQ	Milli-Q (ultračista laboratorijska voda)
MVA	Mevalonatna biosintezna pot
$M_{\rm w}$	Molekulska masa
MWCO	Izključitvena molekulska masa
nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriocetna kislina
obr/min	Obrati na minuto
OD ₆₀₀	Optična gostota izmerjena pri valovni dolžini 600 nm
ORF	Odprt bralni okvir
PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	Fosfatni pufer
PDB	ang. »Protein Data Bank«
pET	Velika skupina plazmidov za čezmerno izražanje rekombinantnih proteinov
pI	Izoelektrična točka
PKS	Poliketid sintaze
pogl.	Poglavje
pregl.	Preglednica
pril.	Priloga
RET	Prenos energije z resonanco (ang. »Resonance Energy Transfer«)
RLU	Relativna enota luminiscence (angl. »Relative Luminescence Unit«)
RLuc	Renilla luciferaza

RNA	Ribonukleinska kislina
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae (navadna pekovska kvasovka)
SDS	Natrijev dodecil sulfat
sl.	Slika
ssDNA	Enoverižna DNA
TAE	Tris/acetat/EDTA pufer
TCS	Pravo konfokalno snemanje (ang. »True Confocal Scanning«)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
T _m	Talilna temperatura
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
tRNA	Prenašalna RNA

V diplomskem delu smo uporabljali kratico DiCP (domena iz cinkovih prstov), da smo s tem ločili med zaporednim nizom cinkovih prstov od enega samega.

Izraz *in vivo* smo uporabljali za procese in poskuse, ki se dogajajo v celici (in ne za celotni živ organizem kot sicer pravi definicija), *in vitro* pa za procese in poskuse, kjer so udeležene sestavine izolirane iz celičnega okolja (in ne za celice izolirane iz živega organizma kot to pravi definicija).

SLOVARČEK

Zn ²⁺ ion. Vežejo se na specifična zaporedja treh nukleotidov, njihova modularna struktura pa omogoča načrtovanje sintetičnih transkripcijskih faktorjev z novim specifičnostmi za uporabo v sintezni biologiji.	Cinkov prst	Motiv cinkovega prsta je eden najpogostejših motivov v DNA vezavnih proteinih. Strukturno so zelo raznoliki, najbolj preučeni pa so cinkovi prsti Cys2-His2 tipa. Slednji so zgrajeni iz dveh β -trakov in ene α -vijačnice, ki jih stabilizira cinkov Zn ²⁺ ion. Vežejo se na specifična zaporedja treh nukleotidov, njihova modularna struktura pa omogoča načrtovanje sintetičnih transkripcijskih faktorjev z novimi specifičnostmi za uporabo v sintezni biologiji.
---	-------------	--

DNA origami DNA origami je tehnika, ki jo je na osnovi pionirskega dela Neda Seemana leta 2006 pod tem imenom predstavil Paul Rothemund iz Kalifornijskega tehnološkega inštituta (CALTECH) in predstavlja ključen tehnološki preboj na področju strukturne DNA nanotehnologije. S to metodo lahko enoverižno molekulo DNA s pomočjo približno 200 t.i. spenjalnih oligonukleotidov v procesu termičnega prileganja zvijemo v poljubno 2D ali 3D obliko.

- EMSA EMSA (ang. »Electrophoretic Mobility Shift Assay«) ali test zamika elektroforezne mobilnosti je metoda za študij interakcij proteinov z DNA ali RNA. Temelji na dejstvu, da kompleks proteina z nukleinsko kislino v gelu (agarozni ali poliakrilamidni) potuje počasneje od obeh posameznih sestavin kompleksa.
- **Fuzijski protein** Fuzijski (tudi himerni) protein dobimo s pomočjo rekombinantne DNA tehnologije z združitvijo dveh ali večih ORF-ov (odprtih bralnih okvirjev), ki sicer vsak zase kodirata svoj protein. Po prepisu takšnega fuzijskega gena dobimo eno multifunkcionalno polipeptidno verigo.
- HeterologenTakšen, ki organizmu ni lasten, npr. heterologna biosintezna pot je tista, kjer v njej
sodelujejo encimi, ki sicer naravno niso prisotni v produkcijskem organizmu.
- Karotenoidi
 Karotenoidi so tetraterpenoidni lipofilni organski pigmenti, ki se v naravi večinoma nahajajo v kloroplastih in kromoplastih rastlin ter še v nekaterih drugih fotosintetskih organizmih. V njih imajo dvojno vlogo: absorbirajo svetlobo za fotosintezo in ščitijo klorofil pred fotodestrukcijo. Poznamo jih več kot 600, delijo pa se v dve veliki skupini: karotene (čisti ogljikovodiki, brez kisika) in ksantofile (vsebujejo kisik). Ljudje in živali jih zaužijemo s hrano (npr. korenje, mango, jajčni rumenjak, špinača itd.). So velika skupina naravnih antioksidantov, nekateri od njih pa imajo tudi aktivnost vitamina A (v telesu se pretvorijo v retinal).
- Ligand Katerakoli molekula, ki se specifično in reverzibilno veže na drugo molekulo ter z njo tvori večji kompleks.
- Metabolni fluks Metabolni fluks pomeni stopnjo pretvorbe molekul v metabolni poti. Uravnavajo ga encimi vključeni v metabolno pot. Nadzorovanje metabolnega fluksa v celicah je pomembno, saj to vpliva na aktivnost celičnih metabolnih poti v različnih razmerah.
- **Metabolni inženiring** Metabolni inženiring označuje vse pristope optimizacije genetskih in regulatornih procesov v celici za povečano produkcijo spojin. Metabolni inženir navadno z matematičnim modelom opiše mrežo metabolnih poti, na podlagi česar ugotovi, kje so možna ozka grla pri produkciji določene spojine in na tej osnovi oblikuje načrt za njeno izboljšanje.
- Metabolon Metabolon je prehoden strukturno-funkcijski kompleks zaporednih encimov v metabolni poti.
- Modularnost Lastnost sistema, zaradi katere se lahko njegovi sestavni deli med seboj ločujejo in povezujejo na nov način.

MultiencimskiMultiencimski kompleks je kompleks polipeptidnih verig z različnimi katalitskimikompleksfunkcijami. Marsikatera naravna biosintezna pot poteka znotraj multiencimskih
kompleksov, kjer fizična interakcija encimov vodi v optimalno biosintezo spojine.

- **Operon** Operon je skupina funkcionalno povezanih genov, katerih izražanje koordinirata promotor in operatorsko mesto, kamor se lahko veže aktivator ali represor. Nujna predpogoja za operon sta sočasno prepisovanje in prevajanje genov, ponavadi iz policistronske mRNA (informacijska RNA). Najdemo jih tako pri prokariontih kot evkariontih
- Ortogonalnost Pojem ortogonalnosti ali tudi neodvisnosti smo sintezni biologi povzeli iz računalništva. Opisuje lastnost sistema, kjer vse njegove sestavine delujejo neodvisno druga od druge. Kot takšna je torej ortogonalnost osnova in pogoj za modularno načrtovanje in sestavljanje novih bioloških sistemov. Zaradi paralelizma številnih reakcij v celici in njihovega nepredvidenega prepletanja s heterolognimi sestavinami je ortogonalnost sintetičnih bioloških sistemov izjemno težko popolnoma zagotoviti.
- **Programska DNA** Programska DNA (lahko tudi DNA program) je nekodirajoče zaporedje DNA z vezalnimi mesti za DNA vezavne domene (npr. domene iz cinkovih prstov). Ko so v sintetičnem biološkem sistemu prisotni fuzijski proteini z DNA vezavno in funkcionalno domeno (npr. encim biosintezne poti), programska DNA usmeri njihovo vezavo na točno določena mesta z določeno medsebojno razdaljo, s čimer vpliva na potek reakcij (poveča njihovo hitrost in specifičnost) med funkcionalnimi domenami.
- **RET** RET (ang. »Resonance Energy Transfer«) označuje neradiativni prenos energije med dvema molekulama z resonanco. Natančneje, gre za dipol-dipol interakcijo med elektronskimi stanji donorja in akceptorja, ki ne vključuje emisije ter ponovne absorpcije svetlobe. Fizikalni pojav v molekularni biologiji izkoriščamo za študij proteinskih interakcij. FRET (prenos energije z resonanco fluorescence) lahko zaznamo med dvema fluorescenčnima proteinoma (npr. med turkiznim in rumenim), BRET (prenos energije z resonanco bioluminiscence) pa npr. med RLuc (*Renilla* luciferaza) in rumenim fluorescenčnim proteinom. Tako za FRET kot BRET je ključno prekrivanje emisijskega spektra donorja z absorpcijskim spektrom akceptorja, pojava pa zaznamo, če sta proteina, ki ju preučujemo, manj kot 100 Å narazen.
- Sintezna biologija Sintezna biologija je bolj kot bazična inženirska veda, ki z združevanjem znanj in orodij molekularne biologije, računalništva in inženiringa predstavlja povsem novo paradigmo na področju znanosti o življenju. Namesto tradicionalnega pristopa od zgoraj dol (ang. »top-down«) uporablja že okarakterizirane (bio)molekule za načrtovanje in sestavljanje bioloških sistemov z novimi lastnostmi, kar predstavlja pristop od spodaj gor (ang. »bottom-up«). Zaradi hkratnega vnašanja številnih (sintetičnih) genov v celice se je sintezne biologije prijel vzdevek »genski inženiring na steroidih«. Ključni pojmi, ki opredeljujejo sintezno biologijo so abstrakcija, standardizacija in avtomatizacija; vsi trije neposredno povezani z napredkom v branju in sintezi DNA ter napredkom v poznavanju osnovnih molekularnih mehanizmov bioloških procesov. Pionirska dela na področju sintezne biologije med drugim segajo na naslednja področja: sintetična genska omrežja za bioremediacijo, metabolni inženiring za sintezo biogoriv in bioaktivnih majhnih molekul, inteligentni sistemi za zdravljenje bolezni, načrtovanje umetnih celic in/ali protocelic ter sinteza celotnih genomov, razširitev genskega koda z nenaravnimi aminokislinami, ksenobiologija. Orodja in pristopi sintezne biologije vedno pomembneje prispevajo tudi k bazičnim raziskavam v znanostih o življenju.

Sintetična ogrodja za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov	Sintetična ogrodja za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov vključujejo proteinska, RNA in DNA ogrodja za mestnospecifično vezavo fuzijskih proteinov (v obliki fuzije encima z ligandom za vezavo na ogrodje). Predstavljajo val novih sinteznobioloških pristopov k izboljševanju metabolnih fluksov biosinteznih poti in tako dopolnjujejo že obstoječe metode metabolnega inženiringa.
Stohastičen	Stohastični ali slučajni procesi so procesi, ki se spreminjajo s časom in/ali krajem v skladu z zakoni verjetnosti. Nasprotje: deterministični procesi.
Usmerjanje substrata	O usmerjanju substrata govorimo takrat, ko vmesni produkt biosintezne reakcije ne oddifundira v raztopino, temveč se zaradi prostorske bližine med encimi takoj usmeri k aktivnemu mestu naslednjega encima biosintezne poti. Usmerjanje substrata vpliva na hitrost in učinkovitost biosintezne reakcije, prav tako pa zaščiti vmesne produkte pred ponorom v stranskih reakcijah.
Vezalno mesto	Mesto na programski DNA ali DNA origamiju, ki vsebuje specifično DNA zaporedje, na katero se lahko veže DNA vezavna domena.
Vmesnik	Kratko zaporedje DNA, ki povezuje dve vezalni mesti za DNA vezavni domeni na programski DNA, s čimer narekuje arhitekturo vezave funkcionalnih domen.

1 UVOD

Sintezna biologija na začetku 21. stoletja napoveduje novo tehnološko revolucijo. Ta izjemno interdisciplinarna veda v biologijo prinaša principe, ki so sicer značilni za inženirske vede: abstrakcijo, standardizacijo in avtomatizacijo. Eden izmed poglavitnih ciljev sintezne biologije je tako načrtovanje predvidljivih, časovno in prostorsko natančno uravnavanih sintetičnih bioloških sistemov. Pri tem se sintezni biolog ne omejuje, saj izbira med široko paleto naravnih sestavnih delov (genov), jih med seboj povezuje in k njim dodaja povsem nove.



Slika 1: Analogija računalništva z življenjem kot ga vidi sintezni biolog (Galitski, 2012: 1). Sintezni biolog celico obravnava kot računalnik zgrajen iz komponent (genov), vrat (reakcij) in modulov (metabolnih poti).

Živa bitja so razvila izjemno veliko število katalitičnih funkcij, ki jih lahko uporabimo za produkcijo medicinsko in industrijsko zanimivih spojin. Nosilce teh funkcij, encime, lahko s tehniko rekombinantne DNA poljubno uvajamo v gostitelje primerne za industrijski proces, s čimer v organizem vnesemo povsem novo ali pa podaljšamo že obstoječo biosintezno pot. Endogena zaporedja encimsko kataliziranih reakcij so tradicionalno izboljševali z metodami metabolnega inženiringa, v zadnjih letih pa je bilo objavljenih nekaj inovativnih sinteznobioloških raziskav, kjer prostorsko usmerjeno kopičenje heterolognih encimov na različnih ogrodjih (proteinskih, RNA in DNA) vodi v boljše izkoristke biosinteze. Takšna sinergija metabolnega inženiringa in sintezne biologije obeta revolucijo v izboljšavi proizvodnje širokega spektra kemikalij (npr. biorazgradljive plastike, biogoriv in terapevtskih molekul) iz enostavnih, poceni, predvsem pa obnovljivih, izhodnih spojin.



Slika 2: (a) Pretvorba sladkorjev v uporabne spojine z mikrobno katalizo (Keasling, 2010: 1355). (b) Primer umetne biosintezne poti (Horinouchi, 2008: 709). (a) Mikrobna produkcija spojin lahko v nekaterih primerih predstavlja zeleno alternativo kemijski industriji. (b) Nastanek flavononov v bakteriji *E. coli* katalizirajo heterologni encimi iz večih organizmov: kvasovke, aktinobakterije, rastline kudzu in likorike.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Ideje, da se številne naravne metabolne poti urejajo v obliki multiencimskih kompleksov, niso nove in segajo približno štiri desetletja nazaj (Srere in Mosbach, 1974). Takšna makromolekularna organizacija, ki je lahko stabilna ali prehodna, vodi v večjo učinkovitost in specifičnost ter lažjo regulacijo metabolnih poti.

S kompleksnostjo sintetične metabolne poti raste verjetnost za njene nepredvidene interakcije z gostiteljskim organizmom, kar vodi v nižje produkcijske titre. Razlog za ta problem so lahko toksični intermediati poti, nižja substratna specifičnost celici tujih encimov in/ali tekmovanje z že obstoječimi metabolnimi potmi v celici.

Po zgledu narave bi torej bilo smiselno heterologne encime približati oziroma kolokalizirati, kar bi zaradi t.i. usmerjanja substratov in intermediatov biosintezne poti med aktivnimi mesti encimov zmanjšalo opisane težave, posledično pa vodilo v izboljšano produkcijo tarčne spojine. Sintetični biološki sistemi, ki tako posnemajo naravo, vključujejo proteinska, RNA in DNA ogrodja. Vsem trem je skupno to, da lahko z ligandi specifičnimi za posamezen element ogrodja, kopičimo encime na točno določenih mestih v celici, kar vodi v optimizacijo biosintezne poti. Za vsako dimerizacijsko domeno, ki so osnova proteinskim ogrodjem, veljajo specifični pogoji zvitja in vstopa v funkcionalne povezave. Prav tako je njihovo število omejeno. Načrtovanje RNA ogrodij na drugi strani je kompleksno, sploh če bi želeli nanje vezati več kot dva encima. Tako se trenutno se zdi, da je DNA ogrodje zaradi svoje predvidljive lokalne strukture in številnih modularno sestavljivih in dobro okarakteriziranih ligandov zanjo, prva izbira, ko gre za načrtovanje prostorsko urejenih biosinteznih poti.



Slika 3: Prostorska organizacija encimov vodi v optimizacijo biosinteznih poti (Lee in sod, 2011). Marsikateri problem sintetičnih metabolnih poti lahko zaobidemo z načrtovanjem sistema na osnovi prostorsko usmerjenega kopičenja encimov. (a) Modre puščice označujejo heterologne encime biosintezne poti vnesene v industrijski mikroorganizem. Metabolizem gostitelja (črne puščice) lahko (z)moti želeno smer in kinetiko prehajanja intermediatov med encimi, kar končno pomeni manjši izkoristek pri nastajanju tarčne spojine. Z rdečo so označeni možni negativni prepleti endogenega metabolizma gostitelja z elementi sintetične metabolne poti: toksičnost intermediatov, izguba intermediatov s sekrecijo ali z njihovo vključitvijo v stranske reakcije, alosterična regulacija. (b) Te probleme lahko omilimo z organiziranjem biosinteznih encimov v multiproteinske komplekse, v katerih je lokalni metabolizem razklopljen od globalnega z izjemo dveh specifičnih točk: vhod substrata v sistem in izhod produkta iz njega (zelena kroga). Takšen pristop načeloma omogoča hkratno prisotnost večih ortogonalnih sintetičnih večkomponentnih kompleksov v celici.

1.2 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

V sesalskih celicah bomo z rekonstitucijo cepljenih fluorescenčnih proteinov (v nadaljevanju tudi FP) mCerulean (turkizni FP) in mCitrine (rumeni FP) skušali zaznati FRET v odvisnosti od prisotnosti DNA ogrodja s specifičnimi vezalnimi mesti za DNA vezavne domene iz cinkovih prstov (v nadaljevanju tudi DiCP).

Raziskali bomo možnost od kemijskih modifikacij popolnoma neodvisne funkcionalizacije DNA origamija, ki razširja pojem DNA ogrodij v dve (2D) oziroma tri razsežnosti (3D). V ta namen bomo okarakterizirali dva fuzijska proteina (MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in MBP-RLuc-2C7-8xHis), s pomočjo katerih bi lahko z BRET-om pokazali princip delovanja takšnih ogrodij.

Po preveritvi vezavnih lastnosti izbranih DiCP bomo endogeno nemevalonatno pot v *E. coli* podaljšali z encimi karotenoidne biosintezne poti (CrtE, CrtB, CrtI, CrtY in CrtZ), molekulo DNA pa uporabili za prostorsko usmerjeno kopičenje teh encimov. V ta namen bomo pripravili biosintezne operone z geni za fuzijske proteine med encimi in DiCP. Pripravili bomo tudi različna plazmidna DNA ogrodja (t.i. programska DNA) za kolokalizacijo fuzijskih proteinov.

Zaključili bomo z obeti, ki jih DNA origami ponuja v luči še kompleksnejših sintetičnih bioloških sistemov *in vivo*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Vezava fuzijskih proteinov med cepljenimi fluorescenčnimi proteini in DiCP na programsko DNA bo v sesalskih celicah vodila v rekonstitucijo funkcionalnih fluorescenčnih proteinov in zaradi ustrezne bližine vezave tudi v FRET.

Fuzijski proteini za funkcionalizacijo DNA origamija bodo ohranili aktivnost (t.j. vezava na DNA, fluorescenca in bioluminiscenca), s čimer bodo uporabni za nadaljnje študije funkcionalizacije DNA origamija.

Encimi karotenoidne biosintezne poti bodo po fuziji z DiCP ohranili aktivnost. Njihova kolokalizacija na DNA ogrodju bo izboljšala izkoristek biosinteze, dolžina vmesnika med vezalnimi mesti za DiCP pa bo narekovala končni produkcijski titer.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROSTORSKA ORGANIZACIJA ENCIMOV

2.1.1 Naravni (multi)encimski kompleksi

2.1.1.1 Bakterijski mikrorazdelki

Znotrajcelične poliedrične organelom podobne strukture sta s transmisijskim elektronskim mikroskopom prvič opazila Drews in Niklowitz že pred več kot 50 leti (Drews in Niklowitz, 1956). Izkazalo se je, da mnogo bakterij prehodno sintetizira te proteinske mikrorazdelke (z drugim imenom tudi metabolosomi), ki bi naj bili vpleteni v vsaj 7 različnih metabolnih procesov. So veliki in strukturno kompleksni bakterijski vključki, ki ponavadi v prerezu merijo okrog 100–150 nm, sestavlja pa jih 10–20 tisoč polipeptidov 10–20 tipov. Njihova skupna lastnost je proteinski plašč iz t.i. BMC (ang. »bacterial microcompartment«) domen. Bakterije v metabolosomih prostorsko ločijo encime metabolnih poti, ki katalizirajo zaporedje reakcij s toksičnimi ali hlapljivimi vmesnimi produkti. S takšno ločitvijo izboljšajo učinkovitost reakcij in/ali zavarujejo citoplazemske komponente (Cheng in sod., 2008).



Slika 4: Struktura plašča bakterijskih mikrorazdelkov (Yeates in sod., 2011: 225). BMC domene se povezujejo v heksamerne (modro) in/ali pentamerne (roza) komplekse, ki skupaj tvorijo virusni kapsidi podoben plašč s porami, ki omogočajo selektivno izmenjavo metabolitov med metabolosomom in ostalo znotrajceličnino.

Na sliki na naslednji strani so predstavljeni trije glavni predstavniki metabolosomov.



Slika 5: (a) Karboksisom (Kerfeld in sod., 2010: 259). (b) Pdu metabolosom (Bobik, 2006: 520). (c) Eut metabolosom (Heldt in sod., 2009: 200). (a) Kolokalizacija encimov RuBisCO (ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza oksigenaza) in karboanhidraze v teh ikozaedričnih bakterijskih vključkih poveča učinkovitost fiksacije CO₂. Najdemo jih pri cianobakterijah in kemoavtotrofih. (b) Rast bakterij *Salmonella enterica* na 1,2-propandiolu inducira nastanek teh proteinskih mikrorazdelkov. V njih se zgodi od koencima B12 odvisna razgradnja 1,2-PD kot vira ogljika in energije. (c) Z delovanjem encimov etanol in aldehid dehidrogenaze v njih poteče oksidacija etanola v acetil-CoA.

Sinteza praznih Pdu metabolosomov v *E. coli* (Parsons in sod., 2010), določitev peptidnega zaporedja, ki omogoča ciljanje heterolognih proteinov vanje (Fan in sod., 2010) in brezcelična rekonstitucija delovanja karboksisomov (Bonacci in sod., 2012) predstavljajo lep obet za njihovo uporabo pri načrtovanju sintetičnih metabolnih sistemov.

2.1.1.2 Lumazin sintazni kompleks

Lumazin sintaza katalizira predzadnji korak biosinteze riboflavina v rastlinah, glivah in mikroorganizmih. Encim se lahko nahaja v dveh kvartarnih strukturah: v glivah jo najdemo v obliki pentamera, v rastlinah in bakterijah pa v obliki 60-mernega ikozaedra (Persson in sod., 1999). 60-mer enkapsulira tri riboflavin sintaze, ki katalizirajo nastanek riboflavina (Bacher in sod., 1980). Wörsdörfer in sod. (2011) so v lumazin sintazo usmerili HIV proteazo, encim, ki je sicer toksičen, kadar je prisoten prost v citoplazmi *E. coli*. Z usmerjeno evolucijo sintetične lumazin sintaze so nato njeno kapaciteto za HIV proteazo povečali 5–10-krat.

2.1.1.3 Enkapsulini

Enkapsulini so, podobno kot lumazin sintazni kompleks, majhni poliedrični proteinski kompleksi s premerom približno 10–25 nm (Lee in sod., 2011). Sutter in sod. (2008) so določili 3D strukturo enkapsulina iz hipertermofilne bakterije *Thermotoga maritima* in ugotovili, da ga sestavlja 60 monomernih podenot. Z bioinformatsko analizo so dognali, da je nukleotidno zaporedje enkapsulinskega monomera pri različnih vrstah vključeno v operon s proteini, ki sodelujejo pri odzivu celice na oksidativni stres (feritinu podobni proteini in peroksidaze). Lokalizacijo teh encimov v notranjost enkapsulinov usmerja značilno, 30–40 aminokislin dolgo, zaporedje na njihovem C-končnem delu.

2.1.1.4 Encimi z metabolnimi tuneli

2.1.1.4.1 Triptofan sintaza

Triptofan sintaza katalizira zadnjo reakcijo L-triptofanske biosintezne poti. Bakterijski encim je 143 kDa velik bifunkcionalen multiencimski kompleks iz dveh α in dveh β podenot. 29 kDa velika α podenota katalizira cepitev indol 3-glicerol fosfata v indol, dve 43 kDa veliki β podenoti pa s kofaktorjem piridoksal fosfatom posredovano sintezo L-triptofana iz indola in L-serina. Celoten kompleks meri približno 150 Å, aktivni mesti obeh podenot, ki sta 25 Å narazen, pa povezuje tunel, skozi katerega se kanalizira indol. Na ta način se hitrost reakcije ob stiku obeh podenot poveča za 1–2 reda velikosti, pri čemer fizična omejitev indola v tunelu preprečuje njegovo difuzijo (Hyde in sod., 1988).



Slika 6: $\alpha_2\beta_2$ kompleks triptofan sintaze iz bakterije *Salmonella typhimurium* (Hyde in sod., 1988: 17860). S temno modro sta označeni α podenoti, z oranžno in rdečo pa β podenoti. Tunel med obema podenotama je označen s svetlo modro.

2.1.1.4.2 Karbamoil fosfat sintetaza (CPS)

Izjemna kompleksnost CPS omogoča hkratno katalizo štirih reakcij, ki iz bikarbonata, glutamina in dveh molekul MgATP vodijo v nastanek karbamoil fosfata. Sinteza slednjega je začetek dveh drugih biosinteznih poti: biosinteze pirimidinskih nukleotidov in cikla uree. Zaradi nastabilnosti vmesnih produktov reakcij so aktivna mesta med seboj povezana s \approx 96 Å dolgim tunelom (Thoden in sod., 1997).



Slika 7: Mehanizem delovanja in struktura karbamoil fosfat sintetaze (Thoden in sod., 2004: 2399). (a) Nastanek karbamoil fosfata iz bikarbonata je posledica 4 zaporednih kemijskih reakcij. (b) Struktura CPS. Encim je zgrajen iz dveh podenot: majhne (α , označena z roza) in velike (β , označena z rumeno, rdečo, zeleno in modro). Aktivna mesta obeh domen povezuje intramolekularni tunel (označen s sivo), ki ščiti labilne vmesne produkte amoniak, karboksifosfat in karbamat.

2.1.1.4.3 Dihidrofolat reduktaza-timidilat sintaza (DHFR-TS)

DHFR-TS je bifunkcionalen encim timidilatnega cikla. Reakcija, ki jo katalizira timidilat sintaza (TS) vodi v nastanek 2'-deoksitimidilata (dTMP) in dihidrofolata (FH₂). Slednji je substrat dihidrofolat reduktaze (DHFR). Domeni (DHFR in TS) sta kovalentno povezani v monomer, delujeta pa kot dimer. Dihidrofolat izjemno učinkovito prehaja med obema aktivnima mestoma, kljub dejstvu, da encim nima intramolekularnega tunela. Še več, FH₂ mora do aktivnega mesta v DHFR priti po zunanji strani encima, torej izpostavljen citosolu. Ker je njegov neto naboj v celici negativen, lahko to pot opravi po elektrostatičnem tunelu, ki ga tvorijo bazične aminokisline izpostavljene na zunanji strani tega encima (Elcock in sod., 1996).

2.1.1.5 MAP kinazna signalna pot v S. cerevisiae

Ste5 je proteinsko ogrodje, ki sodeluje pri regulaciji odziva *S. cerevisae* na paritvene feromone. Protein nase veže vse tri kinaze (Ste11, Ste7 in Fus3), ki so del paritvenega MAPK modula. Bližina zaporedno vezanih z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz (MAP kinaz) v času paritve vodi v optimalno signalizacijo. Sprva so mislili, da je samo ogrodje statično in brez katalitske funkcije, danes pa je znano, da je vpleteno v dinamično regulacijo vezanih MAP kinaz (Alexa in sod., 2010; Bardwell, 2008).



Slika 8: Prostorsko urejanje signalnih poti (Good in sod., 2011: 680, 683). (a) Vezava in kolokalizacija signalnih proteinov na proteinsko ogrodje zmanjša negativne entropične učinke poteka signalizacije. Signalni proteini izgubijo translacijsko in rotacijsko prostostno stopnjo. Ali je to ugodno, je odvisno od fleksibilnosti strukture proteinskega ogrodja. (b) Shema Ste5 proteinskega ogrodja.

2.1.1.6 Multiencimski kompleksi v biosinteznih poteh

2.1.1.6.1 Biosinteza durina

Cianogeni glukozid durin spada v skupino sekundarnih rastlinskih metabolitov, ki ščitijo rastlino pred herbivori. V sirku (*Sorghum bicolor*) je za biotransformacijo L-tirozina v durin potrebnih 7 stopenj, a le trije z membrano asociirani encimi. Prva dva, CYP79A1 in CYP71E1, skupaj katalizirata 6 od 7 reakcij (Conrado in sod., 2009). Kristensen in sod. (2005) so ugotovili, da ima heterologna ekspresija samo prvih dveh encimov biosintezne poti v *Arabidobsis thaliani* zaradi akumulacije toksičnega vmesnega produkta *p*-hidroksimandelonitrila zelo negativen pleitropni efekt na fenotip rastline. Rekonstitucija cele metabolne poti je ta učinek povsem izničila. Nielsen in sod. (2008) so v *A. thaliana* pokazali, da fuzija encimov biosintezne poti durina s fluorescentnimi proteini, vodi v nezaznavne količine končnega produkta. Prav tako so ugotovili, da je znotrajcelična

lokalizacija zadnjega encima v biosintezni poti, citosolne glikozilaze UGT85B, odvisna od hkratne prisotnosti ostalih dveh encimov. Rezultati obeh skupin dokazujejo, da se encimi biosintezne poti durina organizirajo v metabolon.



Slika 9: Biosinteza durina poteče znotraj multiencimskega kompleksa (Conrado in sod., 2009: 493). Vsaka puščica predstavlja eno biosintezno stopnjo.

2.1.1.6.2 Biosinteza šikimata

AROM lokus glive *Aspergillus niduluns*, kjer se nahaja 4812 bp dolg ORF brez intronov, kodira pentafunkcionalen polipeptid, ki katalizira 5 zaporednih reakcij šikimatne biosintezne poti, vsaka funkcionalna domena v nastalem AROM kompleksu pa deluje v obliki homodimera. Zanimivo, v bakterijah najdemo 5 monofunkcionalnih homologov AROM kompleksa, kar kaže, da je nastanek enega samega gena v glivah posledica večih genskih fuzij (Charles in sod., 1986; Hawkins in Smith, 1990).



Slika 10: AROM kompleks (Weeks in Chang, 2011: 5411). Pretvorbo 3-deoksi-D-arabino-heptosolunat 7-fosfata v 5-enolpiruvilšikimat 3-fosfat katalizira dimeren pentafunkcionalen AROM kompleks.

2.1.1.6.3 Biosinteza poliketidov

Modularen je takšen večkomponenten sistem, v katerem lahko sodelujoče sestavne dele predvidjivo zamenjujemo za dosego novih funkcionalnosti. Temu opisu ustrezajo poliketid sintaze (PKS) (Khosla in sod., 2009). Te citosolne megasintaze iz enostavnih naravnih prekurzorjev (acetil-CoA, propionil-CoA, malonil- in metilmalonil-CoA) (Pfeifer in Khosla, 2001) sintetizirajo številne bioaktivne spojine, poliketide, z različnimi aktivnostmi, npr. protimikrobno, protiglivno, protirakavo in imunosupresivno (Kuščer in sod., 2005). Biosintezo tipičnega poliketida lahko razdelimo na tri korake: izbira osnovne enote, izbira podaljševalne enote in modifikacija produkta po biosintezi v PKS (Kuščer in sod., 2005). Najbolj uporabni gostitelji za heterologno produkcijo poliketidov so bakterije (predvsem streptomicete, prav tako *E. coli*) in glive (*A. nidulans, S. cerevisiae*) (Pfeifer in Khosla, 2001). Zaradi sorazmerno dobro poznanih in razvitih molekularno bioloških orodij, ki spremljajo delo z najpomembnejšimi producenti poliketidov, streptomicetami, in zaradi številnih še neodkritih, t.i. kriptičnih biosinteznih poti v njih, Medema in sod. (2011) opisujejo izjemen potencial streptomicet za sintezno biologijo.



Slika 11: Modularna organizacija biosinteze poliketidov (Khosla in sod., 2009: 136). Minimalne komponente nujne za podaljševanje poliketidne verige v 6-deoksieritronolid B-sintazi (DEBS) so ketosintaza (KS), aciltransferaza (AT) in prenašalec acilne skupine (ACP). Tioesteraza (TE) ciklizira nastalo poliketidno verigo in jo sprosti iz C-končnega dela kompleksa. Vsi encimi v tem naravnem biosinteznem tekočem traku so tesno povezani v multifunkcionalne module.

2.1.1.6.4 Celulosomi

Celulosome so leta 1983 odkrili Lamed in sod. Gre za velike, zunajcelične makromolekularne komplekse, ki jih producirajo anaerobni celulolitični mikroorganizmi, s čimer optimizirajo razgradnjo celuloze in drugih polisaharidov celične stene. Zgrajeni so iz večih domen. Skafoldin deluje kot proteinsko ogrodje, kjer se organizirajo encimi za razgradnjo celuloze, vsebuje pa tudi CBD domeno (ang. »Cellulose Binding Domain«), kamor se veže celuloza. Celulotični encimi se preko lastne dokerinske domene povežejo s kohezinskimi domenami, ki so del skafoldina (Doi in Kosugi, 2009; Fierobe in sod., 2002).



Slika 12: Shema supramolekularne strukture tipičnega celulosoma (Bayer in sod., 2004: C-1). (1) Encimi (celulaze) z dokerinskimi domenami se vežejo na primarni skafoldin. (2) Adaptorski skafoldin posreduje vezavo primarnega na (3) sidrnega, ki preko SLH (ang. »S-layer homology«) domene (svetlo rumena) celoten kompleks pripne na celično steno. Različne barve parov kohezin-dokerin (rumena, vijolična in zelena) kažejo na njihovo medsebojno ortogonalnost.

Lego kockam podoben princip zlaganja celulosomskih komponent v multiencimske naprave je osnova za načrtovanje sintetičnih celulosomov (The Cellulosom ...). Fierobe in sod. (2001) so npr. pokazali, da so himerni celulosomi bolj katalitično učinkoviti kot pa proste celulaze *in vitro*. Mingardon in sod. (2007a) na drugi strani poročajo o načrtovanju številnih himernih celulosomov z novimi makromolekularnimi arhitekturami. Mingardon in sod. (2007b) pa so uspeli v sintetični celulosom, poleg bakterijskih, vgraditi tudi glivno celulazo. Opazili so, da takšno vključevanje encima iz nebakterijske vrste ni imelo vpliva na funkcionalnost in katalitsko učinkovitost celulosoma.

2.1.1.6.5 Purinosom

Biosinteza purinov *de novo* poteče v 10 encimsko kataliziranih korakih. Pri evkariontih pri tem sodeluje 6 encimov, od katerih so trije multifunkcionalni: TrifGART katalizira korake 2, 3 in 5, PAICS koraka 6 in 7 ter ATIC koraka 9 in 10. Prokarionti, kot npr. *E. coli*, imajo vse encime, razen bifunkcionalnega ATIC, monofunkcionalne (An in sod, 2008). An in sod. (2008) so s fluorescenčno mikroskopijo v HeLa celicah pokazali, da se vseh 6 encimov ob pomanjkanju purina v citoplazmi uredi v multiencimski kompleks, ki so ga, po vzoru glikosoma (Visser in sod., 1981), poimenovali purinosom. Predlagali so možnost, da so aktivna mesta encimov v purinosomu povezana z metabolnimi tuneli. An in sod. (2010a, 2010b) so z nadaljnjimi raziskavami ugotovili, da je asociacija encimov v purinosom posledica od CK2 proteinske kinaze odvisnih mehanizmov in da je njihova funkcionalnost pogojena z citoplazemsko lokalizacijo na mikrotubulih. Leto kasneje pa so Verrier in sod. ugotovili še, da na njihovo sestavljanje v citoplazmi vpliva z GPCR (z G-proteinom sklopljeni receptor) posredovana signalna pot.



Slika 13: Od aktivacije GPCR do mitoze (Mohr in Kostenis, 2011: 860). GPCR bi naj spodbudili delitev celice in bili vpleteni v rakavo rast. Novoodkrita signalizacija vodi v sestavo 6-encimskih agregatov, purinosomov, ki katalizirajo nastanek inozitol monofosfata (IMP), prekurzorja adenozinskih in gvanozinskih nukleotidov. IMP predstavlja vez med purinosomi in že znanimi, od GPCR odvisnimi, signalnimi potmi.

2.1.2 Sinteznobiološki pristopi k prostorski organizaciji encimov

2.1.2.1 Fuzijski encimi

Če organizacija encimov v proteinske komplekse v naravi vodi v optimizacijo biosinteznih poti, potem je smiselno pričakovati, da bo nenaravna fuzija dveh zaporedno delujočih encimov dala podoben rezultat (Zhang in sod., 2006). Zhang in sod. (2006) so pokazali, da fuzija rastlinskih encimov 4CL (4-kumarat-CoA ligaza iz *Arabidopsis thaliane*) in STS (stilben sintaza iz *Vitis vinifere*) do 15-krat poveča produkcijo rastlinskega poliketida resveratrola v kvasovkah v primerjavi s prostima encimoma. Mullaney in Rehm (2010) sta pripravila fuzijo treh encimov, ki vodijo v sintezo biokompatibilnega in biorazgradljivega polimera polihidroksibutirata (PHB): PhaA (β -ketotiolaza), PhaB (acetoacetil-CoA reduktaza) in PhaC (polihidroksialkanoat sintaza). Fuzijski protein PhaA-PhaB-PhaC je bil aktiven v *E. coli*, produkcijo PHB pa so povečali z optimizacijo povezovalca med PhaA in PhaB. Seo in sod. (2000) so pripravili bifunkcionalen fuzijski encim TPSP, kjer so v eno polipetidno verigo povezali dva encima, ki v *E. coli* katalizirata sintezo trehaloze: TPS (trehaloza-6-fosfat sintetaza) in TPP (trehaloza-6-fosfat fosfataza). Fuzijski encim so izolirali in sintezo trehaloze primerjali z mešanico prostih encimov. Ugotovili so, da je bila katalitska učinkovitost (k_{cat}/K_M) fuzije 3,5–4-krat večja od mešanice prostih encimov.

2.1.2.2 Sintetična ogrodja za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov

Conrado in sod. (2007) so s stohastično simulacijo pokazali, da prostorska organizacija encimov izboljša katalitsko učinkovitost 1,2-propandiolne metabolne poti. Predlagali so, da bi kolokalizacija encimov lahko predstavljala pomemben pristop k izboljševanju sintetičnih metabolnih poti. V naslednjih letih so se njihove teoretične napovedi uresničile.

2.1.2.2.1 Proteinska ogrodja

Dueber in sod. (2009) so predstavili način nadzora metabolnih fluksov s pomočjo proteinskih ogrodij. Biosintezne encime so kolokalizirali na takšno ogrodje preko že okarakteriziranih protein-protein interakcij. Princip so preizkusili na biosintezi mevalonata, prekurzorja številnih terapevtsko in komercialno pomembnih izoprenoidov, ki razen prvega encima acetoacetil-CoA tiolaze (AtoB) vključuje heterologna encima iz kvasovke *S. cerevisiae*: hidroksi-metilglutaril-CoA sintazo (HMGS) in hidroksi-metilglutaril-CoA reduktazo (HMGR). Slednja katalizira stopnjo, ki omejuje hitrost (ang. »rate-limiting step«). Naštete encime so pripravili v obliki fuzij s kratkimi peptidnimi ligandi za interakcijske domene SH3 in PDZ (mišji) ter GBD (podganja). Variirali so stehiometrična razmerja med encimi vezanimi na ogrodje in v najboljšem primeru uspeli biosintezo mevalonata povečati za 77-krat v primerjavi z neorganiziranimi encimi. O podobno uspešni rabi proteinskih ogrodij poročajo še Moon in sod. (2010) ter Agapakis in sod. (2010). Prvi so opazili do 5-kratno povečanje biosinteze glukarne kisline ob prisotnosti proteinskega ogrodja, drugi pa do 3-kratno povečanje biosinteze vodika.



Slika 14: Biosintezni tekoči trak na proteinskem ogrodju (DeLisa in Conrado, 2009: 728). Dueber in sod. (2009) so z vezavo treh encimov mevalonatne biosintezne poti na proteinsko ogrodje uspeli produkcijo mevalonata povečati za 77-krat v primerjavi s biosintezo v odsotnosti proteinskega ogrodja. AtoB je endogen encim *E. coli*, HMGS in HMGR pa izvirata iz kvasovke *S. cerevisiae*. Arhitektura proteinskega ogrodja na sliki ($G_1S_2P_2$) je vodila v najvišje končne produkcijske titre.

2.1.2.2.2 RNA ogrodja

Uporaba RNA za načrtovanje večrazsežnih sintetičnih ogodij za usmerjeno vezavo encimov je zanimiva zaradi dejstva, da lahko takšne strukture celica v procesu transkripcije pripravi sama, česar npr. z DNA (še) ni mogoče. Delebecque in sod. (2011) so predstavili takšen način organiziranja encimov. Načrtovali so RNA ogrodja z različnimi arhitekturami (sl. 15) in nanje s pomočjo ortogonalnih aptamer vezavnih domen pripeli encima biosintezne poti vodika: [FeFe]-hidrogenazo in feredoksin. Produkcija vodika je bila v primerjavi z neorganiziranimi encimi 24-krat večja.



Slika 15: Načrtovanje RNA ogrodij za prostorsko organizacijo proteinov (Delebecque in sod., 2011). Z A in B sta označena encima, z rdečo in oranžno pa aptamer vezavna proteina. Zgoraj so encimi prostoplavajoči v citoplazmi, spodaj pa so predstavljeni trije tipe RNA struktur za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov *in vivo*.
2.1.2.2.3 DNA ogrodja

Ob odkritju strukture molekule DNA leta 1953 (Watson in Crick, 1953) si verjetno nihče ni predstavljal, da bo DNA ob koncu 20. in v začetku 21. stoletja doživela tako veliko preobrazbo. Njeno uporabnost onkraj nosilke genetske informacije je že v začetku 80-ih let preteklega stoletja prepoznal Ned Seeman (Seeman, 1982) in kasneje opisal njeno uporabnost kot strukturni material (Seeman, 2004), iz česar je Rothemund (2006) razvil tehniko DNA origami. V zadnjem letu pa je DNA dobila novo alternativno vlogo: kot ogrodje za usmerjeno vezavo proteinov (Conrado in sod., 2012).

2.1.2.2.3.1 Programska DNA

Nastanek polipeptidne verige je z DNA programiran in z mRNA voden proces, ki poteče po točno določenih navodilih v obliki zaporedja nukleotidnih tripletov – kodonov. Conrado in sod. (2012) smo v sintezno biologijo uvedli nov, alternativen način uporabe DNA za prostorsko usmerjeno vezavo proteinov. Namesto sistema translacije, ki vključuje RNA triplete in tRNA, smo uporabili DNA zaporedja 9 nukleotidov, ki jih prepoznajo DiCP. Vezalna zaporedja za DiCP smo vključili v t.i. programsko DNA, le-to pa v plazmid. Encime treh biosinteznih poti (resveratrolne, 1,2-propandiolne in mevalonatne) smo pripravili v obliki fuzij z DiCP in pokazali od programske DNA odvisno izboljšanje produkcije treh spojin: resveratrola (do 5-kratno izboljšanje), 1,2-propandiola (do 4,5kratno izboljšanje) in mevalonata (do 3-kratno izboljšanje). V takšnem sintetičnem biološkem sistemu kolokalizacija encimov na programski DNA, zaradi podobnih efektov kot so prisotni v naravnih multiencimskih kompleksih (usmerjanje substrata zaradi bližine aktivnih mest), vodi v višje produkcijske titre heterolognih metabolitov. Ključna prednost uporabe programske DNA pred proteinskimi in RNA ogrodji je v njeni predvidljivi lokalni strukturi. Tipična B-DNA naredi vsakih ≈ 10.5 bp (3,4 nm) 1 obrat. S spreminjanjem dolžine vmesnikov med vezalnimi mesti za DiCP lahko nadziramo prostorsko orientacijo vezanih proteinov, vedno bolj cenovno dostopna sinteza DNA pa omogoča načrtovanje in sintezo poljubnih programskih DNA v kratkem času. Velik nabor že okarakteriziranih DiCP (prek 700) ob dejstvu, da lahko DiCP z novimi specifičnostmi relativno enostavno pripravimo (glej poglavje 2.2.1.5), prav tako govorita v prid uporabi DNA ogrodij za prostorsko usmerjeno kopičenje proteinov.



Slika 16: Biosinteza resveratrola na programski DNA (Conrado in sod., 2012: 1883). (a) Sintetični biološki sistem, kjer sta encima 4-kumarat-CoA ligaza (4CL, E1) in stilben sintaza (STS, E2) prek DiCP a (Zif268) in b (PBSII) vezana na programsko DNA. (b) Izražanje fuzijskih proteinov pod nadzorom T7 promotorja.

2.1.2.2.3.2 DNA origami

Strukturna DNA nanotehnologija temelji na principu samosestavljanja ssDNA v dvojne vijačnice na osnovi komplementarnih zaporedij. V letih po prvi omembi uporabe DNA v konstrukcijske namene so bile razvite številne metode za načrtovanje 2D in 3D DNA struktur nanometrskih dimenzij. Vendar je področje svoj pravi zagon dobilo šele leta 2006, ko je kalifornijski računalničar Paul Rothemund predstavil tehniko DNA origami. V procesu termičnega prileganja približno 200 kratkih oligonukleotidov zvije dolgo ssDNA matrično ogrodje v določeno obliko. Prve 2D strukture na osnovi DNA origamija so tako vključevale pravokotnik, zvezdo, trikotnik in smeška (Nangreave in sod., 2010).



Slika 17: Tehnika DNA origami (Samoza, 2009: 9406). Približno 200 kratkih spenjalnih oligonukleotidov (ang. »staple strands«) je potrebnih za zvitje dolge, enoverižne matrične DNA v določeno strukturo.

Tehnika pa ni omejena le na dvodimenzionalne strukture. Tako so Anderson in sod. (2009) uspeli pripraviti škatlico s pokrovom, ki se odpira in zapira. Uporabili so 7249 nt dolgo ssDNA bakteriofaga M13mp18, ki je danes najpogostejše ogrodje za pripravo DNA nanostruktur. Han in sod. (2011) so predstavili način zvitja in ukrivljanja takšnega ogrodja v še kompleksnejše 3D objekte (npr. kroglo, elipsoid ali bučko). Zhao in sod. (2011) pa so predstavili tehniko »superorigami« ali »origami origamijev«, kjer ssDNA bakteriofaga PhiX174 deluje kot sidrišče za vezavo velikega števila 2D DNA origamijev, s čimer lahko pripravimo DNA nanostrukture onkraj omejitev, ki jih postavlja ssDNA bakteriofaga M13mp18. Načrtovanje DNA nanostruktur je podprto z računalniškimi orodji kot sta caDNAno (Douglas in sod., 2009) in CanDo (Castro in sod., 2011).



Slika 18: 3D DNA origami v obliki škatle s pokrovom (Andersen in sod., 2009: 75). Z modro in oranžno sta označena oligonukleotida, ki delujeta kot ključ za odprtje pokrova DNA origami škatle.

DNA origami ima sam po sebi omejeno uporabnost (BIOMOD ..., 2011), omogoča pa vezavo kemijskih zvrsti na točno določena mesta (Nangreave in sod., 2010) z nanometrsko ločljivostjo (Rothemund, 2006). Funkcionalizacija DNA nanostruktur s proteini je precej logična izbira, če pomislimo na številne aktivnosti, ki jih le-ti lahko imajo (encimska, obrambna, strukturna, optična itd.) (BIOMOD ..., 2011). Usmerjeno vezavo proteinov na

DNA nanostrukture lahko dosežemo na več načinov: s konjugacijo proteinov z nukleinskimi kislinami (Wilner in sod., 2009), z vezavo proteinov na aptamere (Chhabra in sod., 2007), z NTA posredovano kelacijo v proteinu prisotne heksahistidinske oznake (Shen in sod., 2009), z ligandi za protitelesa (Williams in sod. 2007) idr.

Pred kratkim so Fu in sod. (2012) pokazali kolokalizacijo dveh encimov na DNA origamiju. Zanimalo jih je, kako medsebojna razdalja med vezanima encimoma vpliva na difuzijo produkta prve reakcije in posledično na učinkovitost celotne dvoencimske kaskade. Ugotovili so, da le-ta z večanjem medsebojne razdalje (10–65 nm) med encimoma pade, kar so potrdili tudi z difuzijskim modelom. Ne glede na razdaljo med encimoma pa je bila učinkovitost reakcije večja kot v sistemu s prostima encimoma.



Slika 19: Z DNA origamijem posredovana kolokalizacija encimov (Fu in sod., 2012: 5516). Encima glukoza oksidaza (GOx) in hrenova peroksidaza (HRP) sta bila pripravljena v obliki konjugata s ssDNA repkom, s katerim sta se vezala na DNA origami.

2.2 DNA VEZAVNE DOMENE

DNA vezavna domena je neodvisno zvita proteinska domena, ki vsebuje vsaj en motiv za prepoznavo eno- ali dvoverižne DNA. Lahko prepozna specifično DNA zaporedje ali pa ima splošno afiniteto do DNA (Lilley, 1995). Udeležene so pri nadzoru transkripcije, podvajanja in modifikacije DNA (npr. restrikcija, metilacija) (Madigan in Martinko, 2006). Luscombe in sod. (2000) so DNA vezavne domene razdelili v 54 družin.



Slika 20: Raznolikost DNA vezavnih motivov (Shrivastava in Tahirov, 2010: 48). V oklepajo na koncu imena motiva je PDB koda strukture. (a) HTH (heliks-zavoj-heliks) motiv (1LMB). (b) wHTH (krilati HTH) motiv (3CO6). (c) Cys2-His2 tip cinkovih prstov (1AAY). (d) Zn2/Cys6 tip cinkovih prstov (3COQ). (e) Motiv levcinske zadrge (2H7H). (f) bHLH (heliks-zanka-heliks) motiv (1AM9). (g) Motiv β -traku (1CMA). (h) Motiv β -ploskve (1NVP).

2.2.1 Cinkovi prsti

2.2.1.1 Odkritje

Leta 1980 so Engelke in sod. iz ekstraktov oocit južnoafriške vodne žabe *Xenopus laevis* izolirali \approx 40 kDa velik protein TFIIIA. Že takrat je bilo znano, da je protein vpleten v regulacijo 5S RNA genov v tej žabi. Delo so leta 1985 nadaljevali Miller in sod., ki so v proteinu odkrili ponavljajoče se, približno 30 aminokislin velike strukturne motive s koordiniranim cinkovim ionom. Zaradi svoje značilne strukture so jih kasneje poimenovali cinkovi prsti.





2.2.1.2 Strukturna razvrstitev cinkovih prstov

Najširša definicija pravi, da je cinkov prst peptidna domena z značilno terciarno strukturo, ki jo stabilizira Zn²⁺ ion (Iuchi in Kuldell, 2005). Njegova prisotnost poveča toplotno in konformacijsko stabilnost cinkovih prstov, večinoma pa ni neposredno vpletena v njihove funkcije (Sri Krishna in sod., 2003). Slednje vključujejo izražanje genov, signaliziranje, celično rast, diferenciacijo in razvoj. Poleg DNA se lahko vežejo tudi na RNA, proteine in majhne molekule (Iuchi in Kuldell, 2005). 3 % človeškega genoma kodira cinkove prste, s čimer so drugi najpogostejši proteinski motiv (Brayer in Segal, 2008).

Sri Krishna in sod. (2003) so cinkove prste razdelili v 8 skupin, te pa naprej na različne družine. Pri razvrstitvi so upoštevali celotno konformacijo prstov in njihovo sekundarno strukturo v okolici koordiniranega cinkovega iona. V določeni meri razvrstitev cinkovih prstov, ki jo predlagajo, sovpada tudi z razlikami v njihovi biološki vlogi.

Preglednica	1: Strukturna	razvrstitev	cinkovih	prstov	in nj	ihove	funkcije	(povzeto	po Sri	Krishna	in	sod.,
2003).												

Skupina*	Družina/-e	Sekundarna struktura	Položaj ligandov za Zn ²⁺	Funkcija
C2H2 podobni	C2H2	β-lasnica (antiparalelna $β$ -trakova med katerima je t.i. cinkov členek; 5 AK dolg obrat – CPXCG) in $α$ -vijačnica	2 iz cinkovega členka, 2 iz C-konca α-vijačnice	vezava na DNA, proteine
Gag členek	retrovirusni Gag členki	2 kratka β-trakova povezana z cinkovim členkom, ki jima sledi kratka α-vijačnica ali zanka	2 iz cinkovega členka, 2 iz kratke α-vijačnice ali zanke	vezava na virusno RNA
<u>Violinski ključ</u>	- FYVE - His-Me endonukleaze	β -lasnica na N-koncu in α -vijačnica na C-koncu, vmes ponavadi še ena β -lasnica in zanka	2 iz cinkovega členka, 2 iz N-konca α-vijačnice	vezava na DNA, RNA in proteine; vezava majhnih molekul
<u>Cinkov trak</u>	- klasični cinkov trak - B-box cinkov prst - Btk motiv	2 β-lasnici (primarna in sekundarna)	2 iz vsakega cinkovega členka	vezava na DNA, RNA; prenos elektronov
Zn2/Cys6 podobni	Zn2/Cys6	α-vijačnica in zanka	2 iz α -vijačnice, 2 iz zanke	vezava na DNA
TAZ2 podobni	TAZ2	α-vijačnice	2 iz N- ali C-konca α- vijačnice	vezava na proteine
Kratka zanka, ki veže cink	/	zanka	vsi iz zanke	neznana
Metalotionein	/	zelo nestrukturirani	/	vezava presežka kovin

*podčrtane skupine so najpogostejše



Slika 22: Strukturna razvrstitev cinkovih prstov (Sri Krishna in sod., 2003: 534). Cinkove prste lahko na osnovi lokalne strukture okoli koordiniranega cinkovega iona razdelimo v 8 skupin. Ligandi, ki koordinirajo cink (oranžen), so predstavljeni kot kroglice in palčke. Modra: α -vijačnica. Rdeča: cinkov členek. Vijolična: primarna β -trakova okoli cinkovega členka. Rumena: ostali β -trakovi. Svetlo zelena: zanka. Siva: deli, ki niso vpleteni v vezavo cinka. (a) C2H2 podobni. (b) Gag členek. (c) Violinski ključ. (d) Cinkov trak. (e) Zn2/Cys6 podobni. (f) TAZ2 podobni. (g) Kratka zanka, ki veže cink. (h) Metalotionein.

2.2.1.3 Molekularna struktura Cys2-His2 cinkovih prstov

Cys2-His2 ali tudi »klasični« cinkovi prsti tvorijo najpogostejšo in najbolj preučeno družino cinkovih prstov (Iuchi, 2005). Njihovo strukturo je leta 1988 prvi predlagal Berg, njegova predvidevanja pa so leto kasneje potrdili Lee in sod. Posamezen prst je zgrajen iz 20–30 aminokislin, njihovo značilno $\beta\beta\alpha$ strukturo po stabilizira tetraedrično koordiniran cinkov ion (Iuchi, 2005). Vezavo hidratiranega cinkovega iona omogočajo ohranjeni aminokislinski ostanki – 2 cisteinska in 2 histidinska – pri čemer se sprosti 6 molekul vode (Hanas in sod., 2005). ΔG (sprememba proste Gibbsove energije) njihovega zvitja in vezave na DNA sta negativna in konstantna v temperaturnem območju 5 do 45 °C, kar pomeni njihovo strukturno stabilnost kot tudi stabilnost vezave na DNA. Konstante asociacije z DNA za triprstne domene so v nM območju (Iuchi, 2005). Tipično zaporedje Cys2-His2 cinkovega prsta opišemo z (F/Y)-X-C-X₂₋₅-C-X₃-(F/Y)-X₅- Ψ -X₂-H-X₃₋₄-H, kjer je X poljubna aminokislina, Ψ pa hidrofobna (Wolfe in sod., 2000). Še en strukturni detajl je cinkov členek, 5 aminokislin dolg obrat med antiparalelnima β -trakovoma z ohranjenim zaporedjem CPXCG, ki je prisoten tudi v drugih družinah cinkovih prstov (Hanas in sod., 2005).



Slika 23: Struktura Cys2-His2 cinkovega prsta (Brayer in Segal, 2008: 112). Značilno $\beta\beta\alpha$ strukturo cinkovega prsta tvorita antiparalena β -trakova (β -lasnica) in α -vijačnica. Celotna struktura je stabilizirana s cinkovim ionom, ki je koordiniran z dvema cisteinskima ostankoma iz cinkovega členka in dvema histidinskima ostankoma iz α -vijačnice.

2.2.1.4 Vezava Cys2-His2 cinkovih prstov na DNA

Cys2-His2 cinkov prst lahko obstaja v treh stanjih: razvit, zvit in vezan na DNA (Iuchi, 2005). Način, kako prepozna določeno DNA zaporedje, sta leta 1991 odkrila Pavletich in Pabo. Za vezavo so ključne aminokisline na položajih -1, 3 in 6 na N-koncu α -vijačnice (mesto 1 pomeni povsem N-končno AK). Te z vodikovimi vezmi interagirajo s tremi zaporednimi bazami v velikem DNA žlebu. V interakciji sodeluje tudi AK na mestu 2, ki se veže na komplementarno verigo (Pavletich in Pabo, 1991). Med sosednjimi prsti je povezovalec z ohranjenim zaporedjem TGEKP. V raztopini je fleksibilen, ob vezavi na DNA pa z lizinskim ostankom interagira s fosfatno hrbtenico DNA. Takšne nespecifične interakcije dodatno ojačajo vezavo (Iuchi, 2005). Vezava triprstne domene nekoliko razvije DNA, ki ima tako namesto značilnih 10,5 11,3 bp na obrat (Pavletich in Pabo, 1991).



Slika 24: (a) Mestnospecifična interakcija cinkovega prsta z DNA (Segal in sod., 2003: 2138). (b) Kompleks Zif268 z DNA (Elrod-Erickson in sod., 1996: 1172). (a) N-končne aminokisline α -vijačnice prepoznajo tarčno zaporedje v velikem DNA žlebu. Tiste na mestih -1, 3 in 6 se vežejo na specifični triplet, aminokislina na mestu 2 pa interagira s fosfatno hrbtenico komplementarne verige. N-končni del cinkovega prsta se veže na 3' konec DNA zaporedja (t.i. antiparalelna vezava). (b) Kompleks DNA vezavne domene iz treh cinkovih prstov in DNA s PDB kodo 1AAY je bil grafično obdelan s programskim orodjem UCSF Chimera ver. 1.5.3 (Pettersen in sod., 2004). Ob vezavi se domena ovije okrog velikega žleba DNA. Cys2-His2 motiv s koordiniranim cinkovim ionom (rdeč) v enem izmed prstov je povečan. β -lasnica posameznega cinkovega prsta je obrnjena stran od DNA, α -vijačnica pa proti njej.

Isalan in sod. (1997) so ugotovili, da specifičnost vezave na DNA narekuje sinergija sosednjih prstov v domeni. Ta opažanja so vodila do sklepa, da Cys2-His2 cinkovi le niso povsem funkcionalno neodvisni moduli.

Kljub temu, da Cys2-His2 cinkovim prstom pripisujemo vlogo DNA vezavnih domen, pa danes vemo, da jih je prek 100 vključenih v interakcije s proteini (Brayer in Segal, 2008).

2.2.1.5 Metode načrtovanja cinkovih prstov z novimi specifičnostmi

Z načrtnim spreminjanjem ali premeščanjem določenih aminokislin v α -vijačnici cinkovega prsta je možno spremeniti njegove DNA vezavne lastnosti. Ob dejstvu, da v nasprotju z npr. heliks-zavoj-heliks motivom, delujejo kot moduli, je to vodilo v razvoj sintetičnih cinkovih prstov z novimi specifičnostmi (Klug, 2005).

2.2.1.5.1 Fagna predstavitev

Fagna predstavitev je tehnologija izražanja eksogenih (poli)peptidov na površini fagnih delcev. Princip je načeloma enostaven: na osnovi knjižnice fagnih delcev, ki izražajo široko paleto peptidov, izberemo tiste, ki vežejo izbrano tarčo. Najpogosteje uporabljeni vektor za ustvarjanje takšnih knjižnic je filamentozni fag M13. Tuj DNA fragment je vstavljen v fagni genom in izražen na njegovi površini kot fuzijski protein z enim od plaščnih proteinov faga (Pande in sod., 2010).



Slika 25: (a) Osnovni princip presejanja fagne knjižnice (Bratkovič, 2010: 750). (b) Izbor cinkovih prstov s fagno predstavitvijo (Choo in Klug, 1995: 431). (a) Fagi iz knjižnice so inkubirani z imobilizirano tarčo (A). Nevezani fagi se sperejo (B), medtem ko se specifično vezani fagi eluirajo (C). Eluirani fagi so razmazani na ploščo z gostiteljsko bakterijo (D), pomnoženi v tekočem mediju (E) in vključeni v nov krog *in vitro* selekcije ter *in vivo* pomnoževanja. Primarno strukturo predstavljenih ligandov določimo s sekvenciranjem DNA vključka (F). (b) Cinkovi prsti predstavljeni na površini filamentoznega faga se v kompleksu s 5' biotinilirano tarčno DNA vežejo na paramagnetne kroglice prevlečene s streptavidinom. Te lahko zberemo z magnetom.

2.2.1.5.2 Bakterijski dvohibridni sistem (B2H)

Selekcijske in presejalne metode predstavljajo močno orodje za študij makromolekularnih interakcij. Primera takšnih metod sta eno- in dvohibridni sistem kvasovke. Joung in sod. (2000) so predstavili analogni bakterijski sistem, ki omogoča hitrejšo analizo večjih knjižnic (zaradi višje stopnje učinkovitosti transformacije in hitrejše rasti *E. coli*). Sistem so preizkusili na knjižnici Cys2-His2 cinkovih prstov. V primerjavi s fagno predstavitvijo, ki zahteva več obogatitvenih ciklov, je ta metoda hitrejša in izvedljiva v enem samem koraku.



Slika 26: (a) B2H selekcija cinkovih prstov s kvasnim *his3* (Joung in sod., 2000: 7385). (b) B2H selekcija cinkovih prstov z β -galaktozidazo (Ramirez in sod., dodatek, 2008: 5). (a) Na levi je avksotrofni sev *E. coli* (z delecijo *hisB*, ki je homolog kvasnega *his3*) s cinkovim prstom (bel oval), ki se ne veže na tarčno DNA zaporedje in zato ne more aktivirati prepisa gena za His3 (encim udeležen v biosintezi histidina), posledično pa celice na selektivnem gojišču (brez histidina) ne rastejo. Na desni je sev s cinkovim prstom (s puščico označen črn oval), ki se veže na tarčno DNA zaporedje, kar preko interakcije z RNA polimerazo aktivira izražanje gena za His3 in celice na selektivnem gojišču lahko zrastejo. (b) Pri B2H je DiCP pripravljena kot fuzijski protein s fragmentom kvasnega Gal11P proteina (GP), α -podenota RNA polimeraze pa kot fuzijski protein s fragmentom kvasnega Gal4 proteina (G4). V predstavljenem primeru se testirana domena veže na tarčno DNA mesto, kar vodi v interakcijo z RNA polimeraznim kompleksom, ki vsebuje R α fuzijski protein, aktivacijo promotorja in izražanje reporterskega gena β -galaktozidaze.

2.2.1.5.3 Modularno sestavljanje



Slika 27: Shema metode modularnega sestavljanja DiCP (Ramirez in sod., dodatek, 2008: 4). Prsti iz arhiva okarakteriziranih cinkovih prstov (modulov) so združeni v triprstno domeno, ki prepozna 9 bp tarčno DNA zaporedje. Posamezni prsti (barvni krogi) prepoznajo 3 bp (barvni pravokotniki).

Ramirez in sod. (2008) so ugotovili, da je modularno sestavljanje cinkovih prstov v domene, ki prepoznavajo 9 bp, nepričakovano manj uspešno kot so to poročali v dveh neodvisnih študijah pred njimi Segal in sod. (2003) in Bae in sod. (2003). Zaključek slednjih dveh študij je bil, da je modularno sestavljanje cinkovih prstov 100 % (Segal in sod., 2003) oz. 60 % (Bae in sod., 2003) učinkovito. Ramirez in sod. (2008) so v eksperimentih z B2H metodo preizkusili vezavo 168 triprstnih domen na 104 različne DNA tarče. Za kar 76 % vezalnih mest niso našli ustrezne DNA vezavne domene. Opazili

so tudi, kakšen je odnos med arhitekturo DNA tripletov in uspešnostjo vezave triprstnih domen na DNA. Modularno sestavljanje je bilo sorazmerno uspešno (pozitivnih 16 od 27 DNA tarč), če je imel vsak izmed DNA tripletov v prepoznavnem mestu na 5' koncu gvanin (5'-GXX-3', X je katerakoli baza). Za vezalna mesta z dvema, enim ali nobenim takšnim tripletom je bilo skupaj pozitivnih le 9 domen (6 za dva 5'-GXX-3' tripleta v prepoznavnem mestu in 3 za enega). Avtorji so zaključili, da je razlog za takšno razhajanje med študijami v dejstvu, da so tako Segal in sod. (2003) kot tudi Bae in sod., (2003) v svojih eksperimentih v večini primerov uporabili DNA tarče z dvema ali tremi DNA tripleti tipa 5'-GXX-3', medtem ko je bila raznolikost njihovih DNA tarč večja.

2.2.1.5.4 Od selekcije neodvisno načrtovanje cinkovih prstov – CoDA

Izhajajoč iz težav povezanih z modularnim sestavljanjem cinkovih prstov so Sander in sod. (2011) razvili metodo CoDA (ang. »Context-Dependent Assembly«). CoDA je prosto dostopna zbirka reagentov in programskih orodij za načrtovanje DiCP z novimi specifičnostmi z visoko uspešnostjo. Glavna prednost metode je njena neodvisnost od časovno zamudnih selekcijskih metod kot sta fagna predstavitev in bakterijski dvohibridni sistem. Osnova metode je načrtovanje novih DiCP na podlagi knjižnic že preverjenih N- in C-končnih prstov, ki so bili funkcionalni skupaj s skupnim srednjim prstom (sl. 28). V ta namen so avtorji objavili arhiv 319 N-končnih prstov (F1) in 344 C-končnih prstov (F3) za katere se je izkazalo, da delujejo, če so povezani z enim od 18 stalnih srednjih (F2) prstov. V nasprotju z modularnim sestavljanjem, CoDA cinkovih prstov ne smatra za neodvisne module, temveč v ozir jemlje od konteksta odvisne efekte med sosednjimi prsti, s čimer je verjetnost, da bo novo načrtovana domena funkcionirala, večja. S metodo CoDA je mogoče sestaviti na ducate večprstnih domen v nekaj tednih ali celo manj z uporabo standardnih metod kloniranja in/ali komercialno DNA sintezo.



Slika 28: Shema načrtovanja DiCP po sistemu CoDA (Sander in sod., 2011: 68). Na shemi zgoraj so cinkovi prsti (F1–F3) in njihova vezavna mesta. Dve različni triprstni domeni, vsaka specifična za svoj nukleotidni nonamer, si delita srednji F2 cinkov prst. DNA vezavno domeno z novo specifičnostjo lahko dobimo tako, da povežemo cinkov prst F1 iz prve domene, skupni cinkov prst F2, in cinkov prst F3 iz druge domene.

2.2.1.6 Zaznavanje bližine vezave na DNA s cepljenimi proteini

V literaturi najdemo številne prikaze uporabe DiCP za zaznavanje specifičnih DNA zaporedij *in vitro*. Kim in sod. (2010) celo predlagajo njihovo uporabo za zaznavanje značilnih DNA zaporedij mikrobnih patogenov, kar bi lahko vodilo v razvoj enostavnih in hitrih POC (ang. »point-of-care«) diagnostičnih testov. Metode takšnega zaznavanja temeljijo na z DNA zaporedjem posredovani rekonstituciji (ang. »SEER – Sequence-Enabled Reassembly«) cepljenih fluorescenčnih proteinov (npr. GFP) (Stains in sod., 2005), luciferaze (Porter in sod., 2008) ali encimov, ki katalizirajo barvno reakcijo (β -laktamaza) (Ooi in sod., 2006). Paleta proteinov, ki jih lahko uporabimo za cepitev je sicer še precej širša (Shekhawat in Ghosh, 2011).



Slika 29: Princip zaznavanja bližine vezave na DNA s cepljenimi proteini (Furman in sod., 2009: 3748). Fuzijska proteina sta najprej brez fluorescenčnih lastnosti. Ob dodatku tarčne DNA pa se DiCP vežeta nanjo, kar inducira rekonstitucijo cepljenih fragmentov v funkcionalni fluorescenčni (ali kakšen drug) protein.

Ooi in sod. (2006) so pokazali, da je signal po rekonstituciji β -laktamaze najvišji takrat, ko sta vezalni mesti za DiCP ločeni z 0 ali 10 bp, s čimer sta cepljena fragmenta encima vezana na isto stran DNA. Pri razdalji 6 bp je bil signal nižji, verjetno zaradi vezave vsakega cepljenega fragmenta na svojo stran DNA. Stains in sod. (2006) na drugi strani pri 0 bp signala sploh niso zaznali, so pa ugotovili, da je najvišji pri 2 bp.

Na osnovi teh dejstev smo zaključili, da je optimalna razdalja med vezalnimi mesti na DNA ogrodju 2 bp, kar pomeni hkrati zadostno bližino med vezalnimi mesti in obenem vezavo fuzijskih proteinov na isto stran DNA.

2.2.1.7 Vezava cinkovih prstov na DNA origami

Slovenska BIOMOD ekipa 2011 (BIOMOD ..., 2011) ter Nakata in sod. (2012) smo pokazali vezavo DiCP na DNA origami. Pristop je neodvisen od kemijske modifikacije proteina, ob hkratni visoki stopnji ortogonalnosti, ki izvira iz številnih že okarakeriziranih DiCP. Funkcionalno domeno lahko s tehnikami rekombinantne DNA pripravimo kot fuzijski protein z DiCP in jo na DNA origami uvedemo z nanometrsko ločljivostjo. V načrtovanje DNA origamija vključimo spenjalne oligonukleotide, ki po termičnem prileganju tvorijo zanko z vezalnim mestom za DiCP, ki štrli iz ravnine DNA origamija (glej tudi sl. 63).



Slika 30: Vezava DiCP na DNA origami (Nakata in sod., 2012: s15). (a) Shema DNA origamija z vezalnimi mesti za dve ortogonalni DiCP (označena z modro in rdečo). (b) AFM slika vezanih DiCP na DNA origami.

2.2.1.8 Izbor DNA vezavnih domen iz cinkovih prstov

2.2.1.8.1 Spletne baze cinkovih prstov

Številne že okarakterizirane DiCP se nahajajo v spletnih bazah kot sta ZifDB (Fu in sod., 2008) in ZifBASE (Jayakanthan in sod., 2009). S pomočjo spletnega orodja ZiFIT pa je mogoče na podlagi že okarakteriziranih cinkovih prstov načrtovati DiCP s povsem novimi specifičnostmi (Sander in sod., 2010).

2.2.1.8.2 Domene vključene v diplomsko delo

V diplomskem delu smo uporabili že okarakterizirane DiCP, ki smo jih izbrali iz literature. Njihove osnovne lastnosti so predstavljene v preglednici 2. Razen za Gli1 in HivC smo gene zanje naročili pri nemški enoti podjetja za sintezo DNA GeneArt. Gena za Gli1 in HivC smo pred začetkom projekta iGEM dobili v paketu BioKock iz MIT.

Ime	Število cinkovih prstov	Prepoznavno zaporedje	Vezavna konstanta	Referenca	Funkcija v referenci
Jazz	3	5'GCTGCTGCG3'	32 nM	Corbi in sod., 2000	regulacija utrofinskega gena
Blues	3	5'GTTTGGATG3'	75 nM	Libri in sod., 2004	regulacija gena za fibroblastni rastni faktor 4 (FGF-4)
Zif268	3	5'GCGTGGGCG(T)3'	2–6 nM	Pavletich in Pabo, 1991	določitev 3D strukture z NMR
PBSII	3	5'GTGTGGAAA3'	v nM območju	Stains in sod., 2005	rekonstitucija cepljenega zelenega fluorescenčnega proteina na dsDNA tarči
HivC*	3	5'GATGCTGCA3'	v nM območju	Reynolds in sod., 2002	inhibicija podvojevanja virusa HIV
Gli1*	5	5'GACCACCCAAGACGA3'	20 nM	Pavletich in Pabo, 1993	določitev 3D strukture z NMR
AZPA4	6	5'TTGGGTGCTTTGGGTGCTC3'	< 3 pM	Sera, 2005	inhibicija podvojevanja virusa BSCTV
2C7	6	5'GCGTGGGCGGCGTGGGCG3'	0,46 nM	Liu in sod., 1997	inhibicija ali aktivacija reporterskega gena (kresničkina luciferaza)

Preglednica 2: DiCP uporabljene v diplomskem delu.

*Domeni Gli1 in HivC sta bili uporabljeni v iGEM projektu Univerze Brown iz ZDA leta 2008.

Med projektom iGEM 2010 smo s testom represije gena za β -galaktozidazo pokazali delovanje izbranih triprstnih in petprstne domene v *E. coli* (iGEM ..., 2010a). Lebar (2011) je te rezultate potrdila v svojem diplomskem delu.

2.2.2 TAL efektorji

V zadnjem času je sinteznobiološka skupnost z velikim navdušenjem sprejela pred tremi leti odkrite TAL (ang. »Transcription Activator-Like«) efektorje (Boch in sod., 2009), ki zaradi svoje bolj predvidljive strukture (Deng in sod., 2012) v nekaterih pogledih morda obetajo še več kot cinkovi prsti (Bogdanove in Voytas, 2011).

2.3 PRENOS ENERGIJE Z RESONANCO (RET)

2.3.1 Osnovni fotofizikalni pojmi

Atomi in molekule lahko obstajajo v različnih kvantnih stanjih, ki ustrezajo različnim energetskim nivojem. Kvantnemu stanju z najnižjo energijo rečemo osnovno stanje, kvantnim stanjem z višjo energijo od osnovnega pa vzbujena. Molekule, katerih elektroni so v vzbujenem stanju, lahko sevajo fotone. Temu procesu pravimo luminiscenca (Ockenga, 2011). Če njen nastanek inducira svetloba (fotoni), govorimo o fotoluminiscenci. Kemiluminiscenčni signal inducira kemijska reakcija. Če pa svetlobo oddaja nek organizem, govorimo o bioluminiscenci. Fotoluminiscenco delimo na fluorescenco in fosforescenco. Pri obeh pojavih svetloba s krajšo valovno dolžino inducira oddajanje svetlobe z daljšo valovno dolžino. Razliko med tema valovnima dolžinama imenujemo Stokesov premik. Bistvena razlika med pojavoma je v trajanju emisije fotonov zaradi vračanja elektronov v osnovno stanje. Pri fluorescenci se to zgodi v nekaj nanosekundah, medtem ko pri fosforescenci to traja precej dlje (nekaj minut ali celo ur). Snovem, ki fluorescirajo, pravimo fluorokromi oz. fluorofori, delu molekule, ki določa barvo pa kromofor (Greb, 2012a).

Za vizualizacijo znotrajceličnih komponent s pomočjo mikroskopa danes pogosto uporabljamo fluorescenčne proteine. Prav vsi izhajajo iz primitivnih morskih organizmov kot so meduze in korale. Osebna izkaznica vsakega fluorescenčnega proteina sestoji iz podatkov o njegovem kvantnem izkoristku (razmerje med emitiranimi in absorbiranimi fotoni), svetlosti (premosorazmerna s kvantnim izkoristkom in molarnim ekstinkcijskim koeficientom FP) in fotostabilnosti (število sekund, ki mine, da FP izgubi 50 % svoje začetne svetlosti). Kromofor zelenega fluorescenčnega proteina (GFP), ki ga sestavljajo tri aminokisline na položajih 65–67, skupaj z okoliškimi aminokislinami določa spektralne lastnosti številnih različic GFP-ja. Danes so tako na voljo fluorescenčni proteini, ki pokrivajo celoten spekter vidne svetlobe. Poleg sprememb v spektralnih lastnostih, pa so mutacije na ključnih mestih GFP-ja vodile v razvoj fluorescenčnih proteinov, ki so manj občutljivi na spremembe v pH, se boljše izražajo in zvijajo v fizioloških razmerah, ne oligomerizirajo, so bolj fotostabilni in imajo večji kvantni izkoristek in/ali svetilnost (Greb, 2012a; Greb, 2012b).



Slika 31: (a) Bakterije, ki izražajo različne fluorescenčne proteine (Tsien, 2009: 5624). (b) Bioluminiscenčna gliva (Ylem, 2009).

2.3.2 Prenos energije z resonanco fluorescence (FRET)

Dinamične proteinske interakcije igrajo pomembno vlogo v številnih celičnih procesih. FRET (ang. »Fluorescence Resonance Energy Transfer«) je fizikalni pojav, ki omogoča študij takšnih interakcij. Za izvedbo te metode je potrebno proteina, ki domnevno interagirata, pripraviti kot fuziji s fluorescenčnima proteinoma med katerima lahko pride do FRET-a (Piston in Kremers, 2007). Teoretične osnove tega pojava je leta 1948 prvi opisal in utemeljil nemški fizikalni kemik Theodor Förster (Förster, 1948). Do FRET-a pride, ko sta ustrezna fluorofora manj kot 1–10 nm narazen. V tem primeru se lahko energija donorja neradiativno prenese na akceptor. Z drugimi besedami: donor ne seva fotona, ki bi ga nato absorbiral akceptor, temveč se energija prenese prek dipol-dipola. Teorija, ki jo je postavil Förster, pravi, da učinkovitost FRET-a pada s šesto potenco razdalje med molekulama:

$$FRET_{eff} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}, \qquad ...(1)$$

kjer R_0 predstavlja karakteristično razdaljo (Försterjev radij), pri kateri je učinkovitost FRET-a 50 % in jo lahko izračunamo za vsak par fluorescečnih molekul, tipično pa znaša okoli 5 nm.

$$R_0 = \left[2, 8 \cdot 10^{17} \cdot \kappa^2 \cdot Q_D \cdot \varepsilon_A \cdot J(\lambda)\right]^{\frac{1}{6}} nm \qquad \dots (2)$$

 κ^2 predstavlja kot med dipoloma obeh fluoroforov (v večini primerov za κ^2 privzamemo vrednost 2/3), Q_D je kvantni izkoristek donorja, ε_A je maksimalni ekstinkcijski koeficient akceptorja, $J(\lambda)$ pa integral regije prekrivanja emisijskega spektra donorja in absorpcijskega spektra akceptorja. Za maksimalni FRET signal je torej pomembno izbrati donor z največjim kvantnim izkoristkom, akceptor z najboljšimi absorpcijskimi lastnostmi in fluorofora s čimbolj prekrivajočima se spektroma. Obstaja več tehnik, kako zaznati FRET med ustrezno označenima molekulama: SE (ang. »Sensitized Emission«), AB (ang. »Acceptor Photobleaching«), FLIM (ang. »Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy«), snemanje spektrov in polarizacijska anizotropija. Nobena od njih, tako kot tudi nobeden od parov fluorescenčnih proteinov za FRET, pa ni idealna (Piston in Kremers, 2007). V diplomskem delu smo FRET zaznali z metodo bledenja akceptorja (AB).

Najbolj primerna partnerja za izvedbo FRET-a sta turkizni (CFP, ang. »Cyan Fluorescent Protein«) in rumeni (YFP, ang. »Yellow Fluorescent Protein«) fluorescenčni protein (Piston in Kremers, 2007), ki smo ju tudi uporabili v diplomskem delu.

Ime	$\lambda_{ex, max} \left[nm \right]^1$	$\lambda_{em, max} \left[nm \right]^2$	Oligomerizacija	Referenca
mCerulean (CFP)	433	475	monomer	Rizzo, 2004
mCitrine (YFP)	516	529	monomer	Griesbeck, 2001

Preglednica 3: Fluorescenčna proteina za FRET uporabljena v diplomskem delu.

 $^{1}\lambda_{ex,max}$ – ekscitacijski maksimum fluorescenčnega proteina $^{2}\lambda_{em,max}$ – emisijski maksimum fluorescenčnega proteina



Slika 32: Prekrivanje spektrov CFP in YFP (Piston in Kramers, 2007: 408). Prekrivanje emisijskega spektra donorja (CFP, modra črta) in absorpcijskega spektra akceptorja (YFP, rumena črta) je ključno za FRET.

Na osnovi FRET-a delujejo tudi genetsko kodirani biosenzorji. Pri njih pride do intramolekularnega FRET-a med fluorescenčnima proteinoma, ki obdajata okoljsko občutljiv peptid. Tipični predstavniki takšnih biosenzorjev so t.i. »kameleoni«, ki zaznavajo Ca²⁺ (Palmer in sod., 2011).

2.3.2.1 in vivo FRET biosenzor za cink

Qiao in sod. (2006) so razvili FRET biosenzor za cink. V ta namen so DiCP transkripcijskega faktorja Zap1, ki je udeležen pri homeostazi cinka v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, obdali s turkiznim (eCFP) in rumenim fluorescenčnim proteinom (eYFP) ter zaznali od vezave cinka odvisno komformacijsko spremembo domene, kar je vodilo v FRET.



Slika 33: Shema cinkovega biosenzorja (Qiao in sod., 2006: 8675). eYFP in eCFP sta pripeta na N- in C-konec dveh cinkovih prstov (ZF1 je rdeč, ZF2 pa zelen) transkripcijskega faktorja Zap1.

2.3.3 Prenos energije z resonanco bioluminiscence (BRET)

BRET, prvič odkrit v morskih bitjih kot sta međuza *Aequorea victoria* in koralnjak *Renilla reniformis*, je proces neradiativnega prenosa energije iz donorja (encim luciferaza, ki katalizira oksidacijo svojega substrata) na akceptor (fluorescenčni protein, ki absorbira energijo donorja in odda svetlobo z daljšo valovno dolžino). Sam pojav je praktično v vsem, razen v izvoru svetlobe, ki omogoči neradiativni prenos energije, soroden FRET-u. To torej pomeni, da je učinkovitost BRET-a prav tako odvisna od razdalje med donorjem in akceptorjem (pada s šesto potenco razdalje), njune medsebojne orientacije ter prekrivanja emisijskega spektra donorja z absorpcijskim spektrom akceptorja (Xia in Rao, 2009).

Za izvedbo eksperimenta, ki vključuje BRET, moramo proteina, ki domnevno interagirata, pripraviti v obliki fuzij z donorjem (običajno je to *Renilla* luciferaza) in akceptorjem (običajno z rumenim fluorescenčnim proteinom). RLuc svoj substrat koelenterazin pretvori v koelenteramid, ob čemer se sprosti svetloba, ki lahko vzbudi akceptor, če se le-ta nahaja znotraj Försterjevega radija (R_0) (Gersting in sod., 2012).

V zadnjem času smo poleg tradicionalnih BRET parov priča številnim novim z izboljšano spektralno ločljivostjo (razlika med emisijskima maksimumoma donorja in akceptorja) (Ayoub in Pfleger, 2010; Dragulescu-Andrasi, 2011).



Slika 34: FRET in BRET za zaznavanje proteinskih interakcij (Hong in sod., 2012: 288). Z rjavo sta označena proteina, ki domnevno interagirata.

Iz odvisnosti od zunanjega vira svetlobe izhaja nekaj slabosti, ki jih ima FRET pred BRET-om, ko gre za študij proteinskih interakcij: bledenje, avtofluorescenca in navzkrižna ekscitacija akceptorja. Nekatera tkiva se lahko pod vplivom obsevanja tudi poškodujejo ali pa so sama po sebi fotoodzivna (večina rastlinskih tkiv) (Xu in sod., 2007).

2.4 KAROTENOIDNA BIOSINTEZNA POT

2.4.1 Naravne vloge karotenoidov in njihova razdelitev

Karotenoidi so tetraterpenoidi, ki jih sintetizirajo rastline in ostali fotosintezni organizmi kot tudi nekatere nefotosintezne bakterije, kvasovke in plesni. Med številnimi ostalimi naravnimi pigmenti predstavljajo pomembno skupino z več kot 600 strukturno raznolikmi spojinami. Osrednja ogljikovodikova veriga z izmenjujočimi se enojnimi in dvojnimi vezmi lahko vsebuje različne ciklične in/ali aciklične končne funkcionalne skupine. Večina njihovih biokemijskih funkcij sloni na sistemu konjugiranih dvojnih vezi, ki so odgovorne za njihovo obarvanost. Nekateri so sestavni del svetlobnega žetvenega kompleksa v kloroplastih, imajo pa tudi pomembno vlogo pri varovanju rastlin pred fotooksidativnimi poškodbami. Rumena, oranžna in rdeča barva številnih sadežev in cvetov je posledica prisotnosti kromoplastov, ki vsebujejo karotenoide. Precej jih je tudi v zelenih delih rastlin, vključno z listi, kjer pa zaradi prisotnosti klorofila niso vidni. Kot barvila jih najdemo v številnih živalskih vrstah: pticah, insektih, ribah in rakih. Živali in ljudje jih sicer ne moremo de novo sintetizirati in smo torej odvisni od njihove prisotnosti v prehrani. Glede na kemijsko sestavo jih delimo na karotene in ksantofile. Slednji se od prvih ločijo po prisotnosti vsaj enega atoma kisika. Med karotene uvrščamo npr. likopen in β-karoten, med ksantofile pa zeaksantin, lutein, kantaksantin in astaksantin (Stahl in Sies, 2004).

2.4.2 Pomen karotenoidov za zdravje človeka

Preglednica 4: Biološke vloge, koristi za zdravje in uporaba pomembnejših karotenoidov (Vílchez in sod., 2011: 324).

Karotenoid	Uporaba in korist za zdravje
likopen	 pri povečani prostati in raku na prostati za preprečevanje ateroskleroze in akutnih ter kroničnih koronarnih sindromov
β-karoten	- deluje kot provitamin A - pri kolorektalnem raku - za preprečevanje akutnih in kroničnih koronarnih sindromov - fotozaščita kože pred UV svetlobo
astaksantin	 pri benigno povečani prostati in tumorjih na prostati in v jetrih ima protivnetne lastnosti
zeaksantin	 pri jetrnih neoplazmah za preprečevanje akutnih in kroničnih koronarnih sindromov pomaga pri ohranjanju normalnega vida za preprečevanje kataraktov za preprečevanje starostno pogojene degeneracije makule (rumena pega)
lutein	 za preprečevanje akutnih in kroničnih koronarnih sindromov ter kapi pomaga pri ohranjanju normalnega vida za preprečevanje kataraktov za preprečevanje starostno pogojene degeneracije makule (rumena pega) za preprečevanje retinitisa za preprečevanje okužbe s <i>Helicobacter pylori</i>

Karotenoidi so torej pomembni sestavni del zdrave prehrane. Večina naštetih vlog v tabeli izhaja iz dejstva, da so karotenoidi učinkoviti antioksidanti (dušijo reaktivne kisikove zvrsti kot npr. singletni kisik in vzbujena tripletna stanja molekul) (Stahl in Sies, 2004).

Svetovno znan primer uporabe genskega inženiringa za izboljšano prehrambeno vrednost živila je t.i. zlati riž (ang. »Golden Rice«). Ta riževa zrna imajo v endospermu heterologne encime za sintezo provitamina A – β -karotena – med drugim tudi encim, ki smo ga uporabili v diplomskem delu (CrtI). Zlati riž rešuje svetovni zdravstveni problem pomanjanjkanja vitamina A (VAD, ang. »Vitamin A Defficiency«) (Ye in sod., 2000).

2.4.3 Biosinteza karotenoidov v E. coli



Slika 35: Biosinteza karotenoidov v *E. coli* (Das in sod., 2007). *E. coli* preko endogene nemevalonatne biosintezne poti (MEP) sintetizira bazen prekurzorjev IPP (izopentenil difosfat) in DMAPP (dimetilalil difosfat). IPP se na različnih stopnjah vključuje v prenildifosfatno pot. Ta je v zadnjem koraku že podaljšana s heterolognim encimom (CrtE – GGPP sintaza), lahko pa se v 5 encimsko kataliziranih stopnjah nadaljuje vse do astaksantina. S sivo, rdečo, oranžno in rumeno so podrčrtani geni za encime, ki smo jih uporabili v diplomskem delu.

Izopentenil difosfat (IPP) in njegov izomer dimetilalil difosfat (DMAPP), ki predstavljata univerzalna sestavna dela za biosintezo karotenoidov (in vseh ostalih izoprenoidov), organizmi sintetizirajo na dva načina: evkarionti po dobro poznani mevalonatni (MVA) poti, prokarionti (z nekaj izjemami) pa po novoodkriti 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfatni (MEP) oz. nemevalonatni poti. Osredotočili se bomo na slednjo, ki je prisotna tudi v E. coli. Prvo reakcijo, kondenzacijo piruvata in gliceraldehid-3-fosfata (G3P) v 1-deoksi-Dksiluloza-5-fosfat (DXP) katalizira DXP sintaza (dxs). Sledi preureditev in redukcija DXP v 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) z encimom DXP reduktoizomeraza (dxr). Naslednjih pet korakov (*ispDEFGH*) vodi v nastanek IPP in DMAPP. Njuno izomerizacijo katalizira encim izopentenil pirofosfat izomeraza (*idi*). Oba prekurzorja vstopita v reakcije podaljševanja verige (prenildifosfatna pot), ki jih v E. coli katalizira FPP sintaza (ispA). V tem delu biosintezne poti nastaneta najprej GPP, nato še FPP. Nastanek slednjega je tudi zadnja endogeno prisotna encimska reakcija karotenoidne biosintezne poti v E. coli. Vse naslednje korake izvedejo heterologni encimi. Prvega izmed njih, in s tem nastanek geranilgeranil difosfata (GGPP), katalizira GGPP sintaza (CrtE). Brezbarvni C40 fitoen nastane s kondenzacijo dveh GGPP po delovanju fitoen sintaze (CrtB). V naslednji reakciji fitoen desaturaza (CrtI) v fitoen vnese 4 dvojne vezi, kar pomeni nastanek prve obarvane spojine, likopena. Reakcijo ciklizacije obeh koncev likopena (in s tem nastanek dveh βiononskih obročev) katalizira likopen β-ciklaza, s čimer dobimo β-karoten. V zaključku biosintezne poti nastanejo kasntofili zeaksantin, kantaksantin in astaksantin. Nastanek prvega katalizira β-hidroksilaza (CrtZ), nastanek drugega ketolaza (CrtO ali CrtW), s kooperativnim delovanjem obeh pa lahko dobimo še astaksantin (Das in sod., 2007).

Encim	Kratica	Reakcija
GGPP sintaza	CrtE	kondenzacija IPP in FPP v GGPP
fitoen sintaza	CrtB	kondenzacija dveh molekul GGPP v fitoen
fitoen desaturaza	CrtI	desaturacija fitoena z vnosom 4 dvojnih vezi
likopen β-ciklaza	CrtY	ciklizacija obeh koncev likopena
β-karoten hidroksilaza	CrtZ	hidroksilacija obeh nastalih β-iononskih obročev

Preglednica 5: Encimi karotenoidne biosintezne poti uporabljeni v diplomskem delu.

Geni za vse encime, ki smo jih uporabili v diplomskem delu in so se izkazali za delujoče, izhajajo iz fitopatogene bakterije *Pantoea ananatis* (včasih imenovana *Erwinia uredowora*; ATCC 19321). Ta bakterija v 6 encimskih stopnjah sintetizira zeaksantin-β-diglukozid (Misawa in sod., 1990), sicer pa povzroča bolezenske simptome pri široki paleti ekonomsko pomembnih kmetijskih rastlin in dreves širom sveta. Prvič so jo odkrili leta 1928 na filipinskih ananasovcih. Je po Gramu negativna fakultativno anaerobna bakterija. V nasprotju z mnogimi drugimi fitopatogenimi mikrobi lahko okuži tudi človeka (Coutinho in Venter, 2009). Zanimivo, vrstni red genov v operonu za zeaksantin, ki smo ga uporabili v diplomskem delu, je bil optimalen tudi v delu Nishizaki in sod. (2007). S pomočjo metode OGAB (ang. »Ordered Gene Assembly in *Bacillus Subtilis*«) so pripravili 5 različnih operonov z različnimi zaporedji genov *crtE, crtB, crtI, crtY* in *crtZ* in jih preizkusili v *E. coli*. Operon *crtEBIYZ* je bil optimalen.



Slika 36: Heterologni del karotenoidne biosintezne poti v *E. coli* s strukturami metabolitov. Barva puščice označuje barvo metabolita za njo. Produkcijo odebeljenih spojin smo pokazali v diplomskem delu. Strukture so pridobljene iz spletne baze spojin z biološko relevanco ChEBI (ang. »Chemical Entities of Biological Interests«).

2.4.4 Metabolni inženiring heterologne mikrobne produkcije karotenoidov

Trenutno se likopen in lutein večinoma pridobivata z ekstrakcijo iz naravnih virov kot so paradižniki in ognjič. Na drugi strani se β -karoten, kantaksantin in astaksantin pridobivajo iz nafte s kemijsko sintezo (Ye in Bhatia, 2012). Komercialni vir karotenoidov so tudi karotenogeni mikrobi in mikroalge kot npr. *Dunaliella salina, Xanthophyllomyces dendrorhous, Haematococcus pluvialis* in *Blakeslea trispora*. Zaradi številnih pozitivnih učinkov na zdravje človeka, dejstva, da potrošniki raje kot po sintetičnih posegajo po naravno pridobljenih prehranskih dodatkih, potencialno nižje cene pridobivanja in nenazadnje zaradi številnih novoodkritih genov iz karotenogenih mikrobov, je zanimanje za mikrobno produkcijo karotenoidov na industrijski ravni v skokovitem porastu (Das in sod., 2007).

Nekarotenogeni mikrobi uporabni za heterologno produkcijo karotenoidov so bakterija *Escherichia coli* in kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* in *Yarrowia lipolytica* (Ye in Bahtia, 2012). Za izboljšano produkcijo karotenoidov v heterolognih mikrobnih gostiteljih je ključno troje: optimizacija bazena prekurzorskih molekul, uravnavanje izražanja karotenoidnih genov in razpoložljivost lipofilnih razdelkov (membran) v celici za shranjevanje nastalih spojin. Številni pristopi metabolnega inženiringa izboljšujejo produkcijske organizme v teh ozirih. Delimo jih v tiste, ki vodijo v izboljšano produkcijo karotenoidov in tiste, ki povečujejo njihovo raznolikost. Za *E. coli* in

tudi ostale nekarotenogene mikrobe je značilna omejena količina izoprenoidnih prekurzorjev, saj spojin, ki iz njih nastanjejo, ne potrebujejo v velikih količinah. V E. coli lahko optimiziramo endogeno nemevalonatno (MEP) pot s čezmernim izražanjem nekaterih ključnih encimov: DXS (DXP sintaza), DXR (DXP reduktoizomeraza) in IDI (izopentenil pirofosfat izomeraza). Izkazalo se je, da IDI katalizira stopnjo, ki omejuje hitrost celotne poti (Lee in Schmidt-Dannert, 2002). Druga strategija je vnos mevalonatne (MVA) poti v E. coli. Znano je namreč, da je sinteza IPP in DMAPP po tej poti učinkovitejša. Z vnosom MVA poti tudi zaobidemo enodgeno povratno regulacijo nemevalonatne poti. Znotraj prenildifosfatne poti lahko z mutacijami FPP sintaze in izborom optimalne GGPP sintaze (npr. CrtE iz *Pantoea agglomerans*) prav tako povečamo produkcijo karotenoidov (Das in sod., 2007). Nivo izražanja karotenogenih encimov, ki omejuje hitrost biosinteze, lahko nadziramo z uporabo plazmidov v majhnem številu kopij in inducibilnimi promotorji. To je pomembno, saj lahko sicer čezmerno izraženi encimi zavrejo rast gostitelja. K raznolikosti končnih produktov karotenoidne biosintezne poti prispeva dejstvo, da lahko karotenogeni encimi iz različnih vrst kooperativno delujejo v heterolognih gostiteljih. Nekateri od teh so promiskuitetni (specifični za več substratov), kar pripomore k raznolikosti. Z usmerjeno evolucijo in s tem spremembami katalitskih lastnosti encimov pa lahko še dodatno razširimo kalejdoskop karotenoidov (Lee in Schmidt-Dannert, 2002). Pomemben je tudi izbor gostitelja. Ena izmed pomembnih prednosti uporabe S. cerevisiae je njen GRAS status (ang. »Generally Recognized As Safe« oz. splošno prepoznan kot varen); iz dejstva, da je modelni organizem, pa izhaja tudi natančno poznavanje njene genetike in fiziologije. Številni procesi za produkcijo spojin v kvasovkah na industrijskem nivoju so prav tako že vzpostavljeni. V nasprotju z bakterijami pri kvasovkah tudi ni težav z okužbami z bakteriofagi (Ye in Bhatia, 2012). Še ena prednost kvasovk je v večji količini membran, kjer se karotenoidi lahko nalagajo. Yarrowia lipolytica lahko tako ob določenih rastnih pogojih vsebuje velika lipidna telesa (Lee in Schmidt-Dannert, 2002; Ye in Bhatia, 2012). Druga možnost pa je načrtovanje E. coli z umetnimi membranskimi vključki (Erikkson in sod., 2009). Zanimiv pristop k optimizaciji heterologne produkcije ksantofilov vključuje hkratno izražanje bakterijskih hemoglobinov. Reverzibilna vezava kisika na hem poveča njegovo dostopnost za hidroksilaze in ketolaze (Ye in Bhatia, 2012).

2.4.5 Ekonomski pomen karotenoidov

Karotenoidi se uporabljajo na področjih farmacevtike, nutracevtike, kot dodatki živalski krmi, prav tako tudi kot barvila v kozmetiki in prehrani (Das in sod., 2007). Skupna tržna vrednost komercialno uporabnih karotenoidov je v letu 2010 znašala 1,2 milijarde ameriških dolarjev, ocenjujejo pa njeno rast na 1,4 milijarde do leta 2018. Trije najbolj prodajani karotenoidi so β -karoten, lutein in astaksantin, ki skupaj predstavljajo več kot polovico trga (BCC Research, 2011).

V okviru ekonomske viabilnosti karotenoidov je zanimiv nov EU projekt z imenom LipoYeasts, s katerim želijo oljno kvasovko *Yarrowia lipolytica* razviti v mikrobnega producenta spojin z visoko industrijsko vrednostjo nastalih iz maščobnih substratov. Med takšne spojine spadajo tudi karotenoidi (Sabirova in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema z navedbo proizvajalca.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Applied Biosystems (ABI)	Naprava za verižno reakcijo s polimerazo Veriti [®] Thermal Cycler
Applied Photophysics	Spektrofotometer Chirascan CD za merjenje CD (cirkularnega dikroizma) s pripadajočim računalniškim programom
Beckman Coulter	Centrifuga J2-HS
Berthold Detection Systems	Luminometer za mikrotitrske plošče Orion II s pripadajočim računalniškim programom Simplicity 4.2
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Biometra	UV transiluminator Ti 3, kad za agarozno gelsko elektroforezo Horizon [®] 11.14
BioRad	Električni napajalnik, navpični sistem za PAGE (poliakrilamidno gelsko elektroforezo) MiniProtean II, sistem za mokri Western prenos Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, ozki nastavki za pipete, plastične kromatografske kolone
Brand	Avtomatska pipeta HandyStep [®] in nastavki zanjo, plastične kivete
Canon	Fotoaparat EOS 1000D za fotografiranje agaroznih gelov in SDS-PAGE gelov barvanih s Commassie modrim
Cole-Parmer	Parafilm
Corbett Research	Naprava za verižno reakcijo s polimerazo
Corning	96-luknjične mikrotitrske plošče za merjenje luminiscence (bele, s polnim dnom)
DNR Bio- Imaging Systems	Naprava za fotografiranje agaroznih gelov in SDS-PAGE gelov barvanih s Commassie modrim
Eppendorf	Termobloka Thermomixer R in Comfort, namizne centrifuge MiniSpin in MiniSpin plus ter 5415R, avtomatske pipete (10 ml, 5 ml, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 10 μ l in 2,5 μ l), nastavki za pipete, mikrocentrifugirke
Euromex	Invertni svetlobni mikroskop
GE Healthcare	Amersham Hybond TM ECL TM nitrocelulozna membrana (0,45 μ m)
Gilson	Avtomatske pipete (10 ml, 5 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl), nastavki za pipete
Gorenje	Mikrovalovna pečica
Hanna Instruments	Magnetno mešalo
Helma	Kvarčne kivete
Hettich	Centrifuga Universal 320R

Turnšek J. Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prst	tov.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012	

nadaljevanje	
Hewlet Packard	Diodni spektrofotometer 8452A s pripadajočim računalniškim programom Chemass
Hoefer	Električni napajalnik
ibidi	8-luknjične mikroskopirne komore za celične kulture (ibidi μ -Slide 8 Well)
IKA	Magnetna mešala, vrtinčnik MS3 basic
inoLab	pH meter WTW series
Invitrogen	Naprava za avtomatsko štetje celic, barvilo tripan modro, števne ploščice
Iskra PIO d.o.o	Brezprašna komora M 18
Kambič	Parni sterilizator A500/700, stresalnik, inkubator
KERN	Tehtnice
Kimberly-Clarck	Rokavice KIMTECH
Lauda	Termostatirana vodna kopel
Leica Microsystems	Invertni konfokalni mikroskop TCS5 SP5 s pripadajočim računalniškim programom Leica LAS AF Lite
LTH	Hladilnik
Malvern	Naprava za merjenje DLS (dinamičnega sipanja svetlobe) Zetaseizer Nano HT s pripadajočim računalniškim programom Zetasizer Software 6.2
Millipore	Sistem za filtriranje
Moulinex	Mikrovalovna pečica SYBIO
MWG Biotech	Naprava za verižno reakcijo s polimerazo Primus 96 Plus Thermal Cycler
Nalgene	Stojala za mikrocentrifugirke
New Brunswick Scientific	Stresalnik/inkubator Innova [®] 42
Nunc	96-luknjične mikrotitrske plošče (bele, s prozornim dnom)
Oregon Scientific	Štoparica
Perkin Elmer	Spektrofotometer LS 55
Sanyo	Skrinja za -80°C
Sarstedt	Nastavki za pipete, falkonke
Sartorius Stedim Biotech	Filtri s porami premera 0,20 ali 0,45 μ m, GVPP filtrirni papir z 0,22 μ m porami, tehtnica
Serva	Dializno črevo Spectra/Por® (MWCO (izključitvena molekulska masa) 3500, 24 mm)
Schott Duran	Vsa steklovina (erlenmajerice, steklenice, čaše ipd.)
Sigma Aldrich	Filtrirni papir za Western prenos Quick Draw blotting paper
Sutjeska	Parni sterlizator
Syngene	Naprava za zajemanje luminiscence in fotografiranje membran po Western prenosu G:BOX

nadaljevanje	
Tehtnica Železniki	Vibracijsko mešalo Vibromix 314 EVT, magnetno mešalo
Tekmar	Ultrazvočna naprava za razbijanje celic Tekmar Sonic Disruptor
Telestar Industrial	Brezprašna komora BIOULTRA 4
Thermo Finnigan	Naprava za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti s pripadajočim računalniškim programom ChromQuest 4.2
Thermo Scientific	Spektrofotometer NanoDrop ND-1000 s pripadajočim računalniškim programom ND-1000 V3.7.1
TPP	Plastični potrošni material (gojitvene posodice za celične kulture, centrifugirke, serološke pipete, falkonke)
Zanussi	Zamrzovalnik -20 °C

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 7: Uporabljene kemikalije z navedbo proizvajalca.

Proizvajalec	Kemikalije
Biosynth	Koelenterazin h
BioWhittaker	Toplotno deaktiviran FBS (fetusni serum goveda)
Calbiochem	Kloramfenikol
Extrasynthèse	β -karoten (čistota \geq 98 %), zeaksantin (čistota \geq 98 %)
Fermentas	DNA standarda GeneRuler TM 1 kbp (kilobazni par) DNA Ladder in GeneRuler TM 50 bp DNA Ladder, proteinski standard PageRuler TM Plus Prestained Protein Ladder, komplet za čiščenje PCR pomnožkov GeneJet TM PCR Purification Kit, komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela GeneJet TM Gel Extraction Kit, komplet za izolacijo plazmidne DNA GeneJet TM Plasmid Miniprep Kit, T4 DNA ligaza, 10x T4 ligacijski pufer, restrikcijski pufri
Finnzymes	Phusion® High-Fidelity (HF) DNA polimeraza
Fluka	L(+)arabinoza, GnHCl (gvanidinijev hidroklorid)
GE Healthcare	Amersham TM ECL TM detekcijski reagent za Western prenos
Helma	Čistilo za kvarčne kivete Hellmanex
Inalco	IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid)
Invitrogen	DMEM (GlutaMAX TM -I, gojišče za celične kulture), AccuPrime TM <i>Pfx</i> DNA polimeraza, 10x AccuPrime reakcijski pufer, fluorescenčno barvilo za jedra Hoechst 34580, 5x »hitri« T4 ligacijski pufer
Kemika	Glicerol
Leica Microsystems	Imerzijsko olje (10 ml, low fluorescence)
Merck	Agar agar, CaCl ₂ x 2H ₂ O, HCl, kvasni ekstrakt, NaCl, SDS (natrijev dodecil sulfat), metanol, NaOH, ledocetna kislina, ZnCl ₂ , izopropanol
New England Biolabs (NEB)	100x BSA (goveji serumski albumin), restrikcijski pufri

Turnšek J. Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012

nadaljevanje

Dharmaaia Diotaah	Liltropure dNTD Set (100 mM dNTD ;;)
Pharmacia Biotech	Oltrapure divite Set (100 milli divite-ji)
Polyplus-transfection SA	jetPEI TM transfekcijski reagent
Pomurske mlekarne	Posneto mleko v prahu
Serva	Commassie [®] Brilliant Blue G-250 (Commassie modro G-250)
Sigma Aldrich	Agaroza, akrilamid, APS (amonijev persulfat), ampicilin, LB (Luria-Bertani) gojišče, β -merkaptoetanol, EDTA (etilendiamintetraocetna kislina), etanol, etidijev bromid, etilacetat, kalijev acetat, kanamicin sulfat, MnCl ₂ x 4H ₂ O, N'N'-metilen-bis-akrilamid, oligonukleotidni začetniki, RbCl, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin), tripton, Tris (tris(hidroksimetil)aminometan), bromfenol modro, Tween-20, DOC (deoksiholat), imidazol, DTT (ditiotreitol), glicin, paraformaldehid, CPI (mešanica proteaznih inhibitorjev), glukoza, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonska kislina), ksilencianol, CDTA (1,2-cikloheksilen-dinitrilo-tetraocetna kislina), Na ₄ O ₇ P ₂ , raztopina tripsina z EDTA, likopen (čistota \geq 90 %)
Quiagen	Ni-NTA (nitrilotriocetna kislina) agarozno polnilo, komplet za odstranjevanje nukleotidov in kratkih dsDNA fragmentov QiaQuick Nucleotide Removal Kit, komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela QIAEX II Gel extraction Kit



Slika 37: Uporabljeni velikostni standardi za elektroforeze. (a) DNA standarda za agarozno gelsko elektroforezo: GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder (levo) in GeneRulerTM 50 bp DNA Ladder (desno). (b) Proteinski standard za SDS-PAGE: PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder.

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 8: Pufri za pripravo kompetentnih celic.

Pufer	Sestava
TFB1	100 mM RbCl, 25 mM MnCl ₂ , 30 mM kalijev acetat, 10 mM CaCl ₂ , 15 % (w/v) glicerol, pH 5,8 (umerjen s HCl)
TFB2	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % (w/v) glicerol, pH 6,8 (umerjen z KOH)

Preglednica 9: Pufri in raztopine za delo z DNA.

Pufer/raztopina	Sestava
raztopina dNTP za PCR	2,5 mM dATP, 2,5 mM dTTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP v MQ
agarozni gel	Za 1 % gel raztopimo 1,0 g agaroze v 100 ml 1x TAE
6x nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25 % (v/v) bromfenol modro, 0,25 % (v/v) ksilencianol, 40 % (w/v) glukoza v dH_2O
50x TAE pufer za agarozno elektroforezo	2 M Tris, 5,71 % (v/v) ledocetna kislina, 50 mM EDTA, pH 8,0

Preglednica 10: Pufri in raztopine za delo s celičnimi kulturami.

Pufer/raztopina	Sestava
10x PBS (fosfatni pufer)	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
NaCl za transfekcijo z JetPei TM	150 mM NaCl

Preglednica 11: Raztopine za pripravo celic za mikroskopiranje s konfokalnim mikroskopom.

Raztopina	Sestava
raztopina paraformaldehida	S segrevanjem raztopimo 0,4 g v 10 ml 1x PBS
raztopina za barvanje celičnih jeder	Raztopina fluorescenčnega barvila Hoechst 34580 (1 μ g/ml v 1x PBS)

Preglednica 12: Pufri in raztopine za delo s proteini.

Pufer/raztopina	Sestava
raztopina glukoze	Sterilno filtrirana raztopina 4 M glukoze
raztopina ZnCl ₂	Sterilno filtrirana raztopina 1M ZnCl ₂
mešanica proteaznih inhibitorjev CPI-His6	Mešanica proteaznih inhibitorjev za izolacijo proteinov s heksahistidinsko oznako (His6), brez EDTA
10 % ločitveni poliakrilamidni gel	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) akrilamid/bis, 0,05 % (w/v) APS, 0,05 % (v/v) TEMED
4 % vstopni poliakrilamidni gel	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 4 % (w/v) akrilamid/bis, 0,05 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
4x nanašalni pufer za SDS-PAGE z reducentom	138 mM SDS, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40 % (v/v) glicerol, 10 % (v/v) β -merkaptoetanol, 0,1 % (w/v) bromfenol modro
10x pufer za SDS-PAGE	250 mM Tris, 1,92 M glicin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3 (pred SDS-PAGE 10-krat redčimo z dH2O)
Commassie modro	0,2 % Commasie modro G-250, 30 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ledocetna kislina
raztopina za razbarvanje SDS- PAGE gela	30 % (v/v) etanol, 20 % (v/v) ledocetna kislina
pufer za mokri Western prenos	25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol, pH 8,3

Turnšek J. Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012

nadaljevanje

J. J. J.	
10x TBS	250 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,4
pufer za spiranje (Western prenos)	1x TBS, 0,1 % Tween-20, pH 7,4
pufer za blokiranje (Western prenos)	1x TBS, 0,1 % Tween-20, 5 % (w/v) nemastno mleko v prahu, pH 7,4
pufer za inkubacijo nitrocelulozne membrane s 1° ali 2° protitelesi	1x TBS, 0,1 % Tween-20, 1 % (w/v) nemastno mleko v prahu, pH 7,4
lizni pufer	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,1 % DOC, 100 μM ZnCl_2, 1:500 CPI-His6, 1 mM DTT, pH 8,0
regeneracijski pufer	6M GnHCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM Tris, 500 mM imidazol, pH 5,8
vezalni pufer	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μM ZnCl ₂ , 1 mM DTT, pH 8,0
pufer W1	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μM ZnCl2, 1 mM DTT, 20 mM imidazol, pH 8,0
pufer W2	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μM ZnCl_2, 1 mM DTT, 50 mM imidazol, pH 8,0
pufer W3	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μM ZnCl2, 1 mM DTT, 100 mM imidazol, pH 8,0
pufer E	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μM ZnCl2, 1 mM DTT, 250 mM imidazol, pH 8,0
dializni pufer	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 µM ZnCl ₂ , 1 mM DTT, pH 8,0
dializni pufer	20 mM Tris-HCI, 100 mM NaCI, 100 µM ZnCI ₂ , 1 mM D11, pH 8,0

Preglednica 13: Pufer za test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA).

Pufer	Sestava
EMSA pufer	20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μ M ZnCl ₂ , 1 mM DTT (dodan svež), 1 μ g/ml BSA, pH 8,0

Preglednica 14: Pufer za testiranje aktivnosti fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis.

Pufer	Sestava
pufer za preverjanje aktivnosti <i>Renilla</i> luciferaze (RLuc)	7,5 mM Na ₄ O ₇ P ₂ , 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 250 mM NaCl, 5 mM CDTA, 0,01 % metanol, 1 μ M koelenterazin h (raztopljen v metanolu), pH 5,0

Preglednica 15: Raztopine za eksperimente z biosintezo karotenoidov.

Raztopina	Sestava
raztopina arabinoze	Sterilno filtrirana 10 % (w/v) raztopina L(+)arabinoze

3.1.4 Plazmidi

Preglednica 16: Uporabljeni plazmidi.

Plazmid	Vir
pSB1AK3	BioBrick TM / Tom Knight laboratorij, MIT, ZDA
pSB1AK8 s CMV promotorjem	BioBrick TM / iGEM Slovenija 2008
pSB1K3	BioBrick TM / Tom Knight laboratorij, MIT, ZDA
pSB1C3	$BioBrick^{TM}$ / Tom Knight laboratorij, MIT, ZDA
pSB4C5	$BioBrick^{TM}$ / Tom Knight laboratorij, MIT, ZDA
pET41a(+)	Novagen
mCerulean-C1	Clontech

3.1.4.1 pSB1AK3

Plazmidni vektor v velikem številu kopij (100–300 na celico) vsebuje gena za odpornost proti ampicilinu (Amp^r) in kanamicinu (Kan^r) ter pMB1 replikon, ki izhaja iz plazmida pUC19. Med restrikcijska mesta za kloniranje po sistemu BioKock je vkloniran *ccdB*, ki kodira CcdB toksin. Slednji inhibira delovanje encima giraze, ki je ključen pri delnem razvitju bakterijske DNA pred začetkom podvajanja ali transkripcije (Dao-Thi in sod., 2005) in torej predstavlja pozitivni selekcijski marker: preživijo samo tiste celice, ki nimajo tega gena. Za namnoževanje plazmidov s *ccdB* sicer uporabljamo sev *E. coli* DB3.1. Plazmid smo uporabili za pripravo DNA konstruktov za testiranje FRET-a v sesalskih celicah in za kloniranje fuzijskih proteinov med encimi karotenoidne biosintezne poti in DiCP.



Slika 38: Plazmidni vektor pSB1AK3.

3.1.4.2 pSB1AK8 s CMV promotorjem

Plazmidni vektor v velikem številu kopij (100–300 na celico) vsebuje gena za odpornost proti ampicilinu (Amp^r) in kanamicinu (Kan^r) ter replikon pMB1, ki izhaja iz plazmida pUC19. Plazmid je modifikacija pSB1AK3, ki sta mu bila dodana evkariontski terminator in CMV promotor. V ta plazmid smo vklonirali vse končne DNA konstrukte za testiranje FRET-a na programski DNA v sesalskih celicah.



Slika 39: Plazmidni vektor pSB1AK8 s CMV promotorjem.

3.1.4.3 pSB1K3

Plazmidni vektor v velikem številu kopij (100–300 na celico) vsebuje gen za odpornost proti kanamicinu (Kan^r) in replikon pMB1, ki izhaja iz plazmida pUC19. Med restrikcijska mesta za kloniranje po sistemu BioKock je vkloniran *ccdB*, ki kodira CcdB toksin. V ta plazmid smo vklonirali programsko DNA za eksperimente z biosintezo karotenoidov.



Slika 40: Plazmidni vektor pSB1K3.

3.1.4.4 pSB1C3

Plazmidni vektor v velikem številu kopij (100–300 na celico) vsebuje gen za odpornost proti kloramfenikolu (Cm^r) in pMB1 replikon, ki izhaja iz plazmida pUC19. Med restrikcijska mesta za kloniranje po sistemu BioKock je vkloniran *ccdB*, ki kodira CcdB toksin. V ta plazmid smo vklonirali programsko DNA za eksperimente s FRET-om v sesalskih celicah. Z letom 2010 je pSB1C3 postal plazmid, v katerem morajo študentske ekipe na tekmovanju iz sintezne biologije iGEM poslati svoje DNA konstrukte v ZDA.



Slika 41: Plazmidni vektor pSB1C3.

3.1.4.5 pSB4C5

Plazmidni vektor v majhnem številu kopij (~ 5 na celico) vsebuje gen za odpornost proti kloramfenikolu (Cm^r), pMB1 replikon, ki izhaja iz plazmida pUC19, pSC101 mesto začetka podvojevanja (*repA*) in *ccdB*, ki kodira CcdB toksin. pMB1 zagotavlja, da lahko plazmid pred kloniranjem namnožimo v zadostni koncentraciji. Pred vnosom DNA konstrukta v plazmid po sistemu BioKock pa plazmid režemo tako, da izgubi ta replikon (prav tako *ccdB*), s čimer postane plazmid v majhnem številu kopij. V ta plazmidni vektor smo vklonirali operone za biosintezo karotenoidov (likopen, β -karoten in zeaksantin).



Slika 42: Plazmidni vektor pSB4C5.

3.1.4.6 pET-41a(+)

pET plazmidni vektorji v majhnem številu kopij podjetja Novagen se uporabljajo za čezmerno izražanje proteinov v bakterijskih celicah. pET-41a(+) je namenjen izražanju proteinov v obliki fuzij z GST (glutation S-tranferaza). Plazmid vsebuje gen za odpornost proti kanamicinu (Kan^r), lac operator, T7 promotor, T7 terminator, številne oznake (S, heksa- in oktahistidinsko) in proteazna cepitvena mesta (trombinsko in enterokinazno). Plazmid smo uporabili za čezmerno ekspresijo fuzijskih proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija.



Slika 43: Plazmidni vektor pET41a(+). Gena za fuzijska proteina za funkcionalizacijo DNA origamija sta bila vklonirana med NdeI in XhoI restrikcijski mesti.

3.1.4.7 mCerulean-C1

Clontech-ov plazmid v velikem številu kopij za izražanje turkiznega fluorescenčnega proteina mCerulean v sesalskih celicah. Vsebuje gen za odpornost proti kanamicinu in neomicinu (Kan^r / Neo^r). Plazmid je bil del negativne kontrole pri merjenju FRET-a.



Slika 44: Plazmidni vektor mCerulean-C1.

3.1.5 Restrikcijski encimi

Restrikcijski encim	Izvorni organizem	Prepoznavno mesto	Proizvajalec
AatII	Acetobacter aceti	5' GACGT↓C 3'	Fermentas
AlwNI	Acinetobacter Iwoffii N	5' CAGNNN↓CTG 3'	New England BioLabs
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens H	5' G↓GATCC 3'	Fermentas
EcoRI*	E. coli RY13	5' G↓AATCC 3'	Fermentas
HindIII	Haemophilus influenzae Rd	5'A ↓AGCTT 3'	Fermentas
NdeI	Neisseria denitrificans	5'CA↓TATG 3'	Fermentas
PstI*	Providencia stuartii 164	5' CTGCA↓G 3'	Fermentas
SacI	Streptomyces achromogenes	5' GAGCT↓C 3'	Fermentas
SpeI*	Sphaerotilus natans	5' A↓CTAGT 3'	Fermentas
XbaI*	Xanthomonas badrii	5' T↓CTAGA 3'	Fermentas
XhoI	Xanthomonas holcicola	5' C↓TCGAG 3'	Fermentas

Preglednica 17: Uporabljeni restrikcijski encimi.

*sestavni del kloniranja po sistemu BioKock

3.1.6 Protitelesa

Preglednica 18: Uporabljena protitelesa.

Vrsta protiteles	Opis	Proizvajalec / kataloška številka
primarna protitelesa	mišja monoklonska protitelesa specifična za 4 histidinske aminokislinske ostanke, brez BSA	Qiagen / 34670
sekundarna protitelesa	kozja poliklonska protitelesa proti mišjim IgG konjugirana s HRP (hrenovo peroksidazo)	Santa Cruz Biotechnology / sc-2005

3.1.7 Organizmi

3.1.7.1 Bakterijski sevi

Preglednica 19: Uporabljeni bakterijski sevi E. coli.

Sev	Genotip	Uporaba	Vir
DH5a	F/supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	standardni laboratorijski sev za kloniranje in namnoževanje plazmidne DNA	Zbirka sevov Kemijskega Inštituta
BL21(DE3)pLysS	$F ompT gal dcm lon hsdS_B(R_B m_B) \lambda(DE3[lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5]), pLysS (CamR)$	sev <i>E. coli</i> za čezmerno izražanje rekombinantnih proteinov	Zbirka sevov Kemijskega Inštituta
BW27783	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787 (::rrnB- 3), λ^{*} , Δ(araH-araF)570(::FRT), ΔaraEp-532::FRT, φP_{cp8} araE535, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	sev <i>E. coli</i> za homogeno izražanje genov pod pBAD promotorjem	Barry L. Waner (Khlebnikov in sod., 2001)

3.1.7.2 Celične kulture

Preglednica 20: Uporabljene celične kulture.

Celična kultura	Opis	Uporaba	Vir
HEK293	HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo človeških zarodnih ledvičnih celic z DNA adenovirusa 5	zaznavanje FRET-a na programski DNA	Carsten Kirschning (Tehniška Univerza München)

3.1.8 Gojišča

Bakterijske celice *E. coli* smo gojili na/v LB gojišču ali 2x YT (kvasni tripton) gojišču z dodano glukozo in ZnCl₂. HEK293 celično linijo smo gojili v DMEM-u z dodanim 10 % (v/v) FBS.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava gojišč

3.2.1.1 Bakterijska gojišča

Preglednica 21: Sestava LB gojišča.

Kemikalija	Tekoče LB gojišče	Trdno LB gojišče
LB	25 g/l	25 g/l
agar		15 g/l

Kemikalija	Tekoče 2x YT gojišče
kvasni ekstrakt	10 g/l
tripton	16 g/l
NaCl	5 g/l
glukoza	10 g/l
$ZnCl_2$	0,1 mM ali 0,5 mM

Preglednica 22: Sestava 2x YT gojišča z dodano glukozo in ZnCl₂.

Sestavine gojišč (pregl. 21 in 22) smo raztopili v destilirani vodi in sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto. Filtrirani založni raztopini glukoze in ZnCl₂ smo sterilno dodali v gojišče do ustreznih koncentracij. Tekoča gojišča smo do uporabe hranili na sobni temperaturi. Primerno ohlajeni mešanici za trdna gojišča smo sterilno dodali ustrezne antibiotike do naslednjih končnih koncentracij: 35 mg/l (kloramfenikol), 50 mg/l (kanamicin) in 75 mg/l (ampicilin). Nato smo gojišče pomešali, da se je antibiotik v njem enakomerno porazdelil, in ga sterilno vlili v pripravljene petrijevke. Trdna gojišča smo do uporabe hranili na 4 °C.

3.2.1.2 Gojišče za celične kulture

DMEM z 10 % (v/v) FBS smo pripravili tako, da smo v 0,5 l svežega DMEM-a sterilno dodali 55 ml FBS.

3.2.2 Sterilizacija steklovine, gojišč, raztopin in pufrov

Na visoke temperature neobčutljiv material (steklovina, gojišča, raztopine in pufri) potreben za gojenje bakterijskih in celičnih kultur ter izvedbo eksperimentov smo avtoklavirali po standardnem postopku sterilizacije z vlažno toploto (20 min, 121 °C, 1,2 bar). Toplotno občutljive raztopine in pufre smo sterilizirali s filtracijo skozi filtre s porami premera 0,22 ali 0,45 μ m.

3.2.3 Osnovne metode molekulskega kloniranja

Metode molekulskega kloniranja so natančno opisane v številnih priročnikih iz tega področja (Sambrook in Russel, 2006), v nadaljevanju pa so predstavljene le tiste, ki smo jih uporabili pri delu.

3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižne reakcije s polimerazo smo izvedli z DNA polimerazama AccuPrimeTM Pfx ali Phusion[®] High-Fidelity (HF). Vsebina reakcijskih mešanic in temperaturni profili reakcij so opisani v preglednicah 23–26.

Sestavina reakcije	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen [µl]
matrična DNA	10 ng/µl	0,4 ng/µl	2
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	1
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/µl	0,4 pmol/µl	1
AccuPrime reakcijski pufer	10x	1x	5
AccuPrime TM Pfx DNA polimeraza	2,5 U/µl	0,05 U/µl	1
MQ			40

Preglednica 23: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo AccuPrimeTM Pfx.

Preglednica 24: Temperaturni profil verižne reakcije z DNA polimerazo AccuPrimeTM *Pfx*.

Stopnja		Temperatura [°C]	Čas
(1) začetna denaturacija		95	2 min
(2) 30 ciklov	denaturacija prileganje začetnih oligonukleotidov	95 T _m 68	15 sek 30 sek 1 min/1 kbp
(3) končno podaljševanje	podaljsevalije	68	7 min
		4	œ

Preglednica 25: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNA polimerazo Phusion[®] High-Fidelity (HF).

Sestavina reakcije	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen [µl]
matrična DNA	10 ng/µl	0,4 ng/µl	1
začetni oligonukleotid 1	5 pmol/µl	0,2 pmol/µl	1
začetni oligonukleotid 2	5 pmol/µl	0,2 pmol/µl	1
dNTP-ji	2,5 mM	0,2 mM	2
Phusion HF reakcijski pufer	5x	1x	5
Phusion [®] HF DNA polimeraza	2 U/µl	0,02 U/µl	0,25
MQ			14,75

Preglednica 26: Temperaturni profil verižne reakcije z DNA polimerazo Phusion[®] High-Fidelity (HF).

Stopnja		Temperatura [°C]	Čas
(1) začetna denaturacija		98	2
(2) 30 ciklov	denaturacija prileganje začetnih oligonukleotidov podalševanje	98 T _m 72	15 sek 30 sek 20 sek/1 kbp
(3) končno podaljševanje		72	5 min
		4	∞
Talilno temperaturo začetnih oligonukleotidov (T_m) smo izračunali z enačbo:

$$T_m = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (G + C)$$
 ...(3)

PCR pomnožke smo očistili iz agaroznega gel kot je opisano v poglavju 3.2.3.3 ali pa smo jih očistili s pomočjo komericalno dostopnega kompleta za čiščenje PCR pomnožkov GeneJetTM PCR Purification Kit.

3.2.3.2 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost verižnih reakcij s polimerazo, kontrolnih restrikcij in restrikcij plazmidnih vektorjev. Gostoto gela smo prilagodili pričakovanim dolžinam DNA fragmentov; običajno je znašala med 0,5 in 2 % (w/v). Ustrezno količino agaroze smo vmešali v 100 ml 1x TAE pufra in jo s segrevanjem raztopili v mikrovalovni pečici. V rahlo ohlajeno raztopino agaroze smo dodali 2 μ l etidijevega bromida (10 g/l) in gel vlili v kadičko. Po strditivi gela smo v žepke nanesli vzorce z 1x nanašalnim pufrom in velikostni DNA standard. Elektroforeza je potekala 1 uro pri stalni napetosti 100 V v 1x TAE pufru. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali pod UV lučjo.

3.2.3.3 Čiščenje DNA iz agaroznega gela

Za čiščenje DNA (pomnožki verižnih reakcij s polimerazo, rezani plazmidni vektorji in DNA fragmenti) iz agaroznega gela smo uporabili komercialno dostopen komplet GeneJetTM Gel Extraction Kit (Fermentas). Pričakovani DNA fragment smo s skalpelom izrezali iz gela, ga prenesli v mikrocentrifugirko in očistili po navodilih proizvajalca. Metoda vključuje uporabo kolon s silika membrano, kamor se med postopkom čiščenja selektivno adsorbirajo nukleinske kisline. Alternativno smo za isti namen uporabili komercialno dostopen komplet QIAEX II Gel Extraction Kit, ki temelji na adsorpciji DNA na silika kroglice.

3.2.3.4 Restrikcija DNA

Plazmidne vektorje, pomnožke verižnih reakcij s polimerazo in produkte prileganja oligonukleotidov smo rezali z restrikcijskimi endonukleazami, ki prepoznavajo točno določena restrikcijska mesta (pregl. 17). Reakcijska mešanica je vsebovala matrično DNA, 1x reakcijski pufer, 0,5 µl vsake od uporabljenih restrikcijskih endonukleaz (10 U/µl) na 1 µg DNA in MQ do končnega volumna 20 µl (kontrolne restrikcije) ali 50 µl (restrikcije za kloniranje). Običajno smo rezali od 300 ng (kontrolne restrikcije) do 4 µg DNA (restrikcije plazmidnih vektorjev ali produktov verižnih reakcij s polimerazo). Restrikcije smo inkubirali 1–4 ure pri 37 °C, odvisno od količine DNA. Med restrikcijami večjih količin DNA (npr. 4 µg plazmidnega vektorja) smo po 2 urah restrikcijski mešanici dodali 0,5 ali 1 µl svežih restrikcijskih encimov. Restrikcije PCR pomnožkov in produktov prileganja oligonukleotuidov smo očistili s pomočjo komercialno dostopnega kompleta QiaQuick Nucleotide Removal Kit, rezane plazmidne vektorje pa iz agaroznega gela.

3.2.3.5 Prileganje oligonukleotidov

Po 15 μ l vsakega od oligonukleotidov s koncentracijo 20 μ M smo v napravi za verižno reakcijo s polimerazo segrevali 5 min pri 95 °C ter nato postopoma ohlajali do sobne temperature.

3.2.3.6 Ligacija

Z ligacijo vnesemo DNA fragment v plazmidni vektor. T4 DNA ligaza, ki smo jo uporabili pri tem postopku, tvori fosfodiestersko vez med dvema koncema DNA molekule. Ključnega pomena pri tem je restrikcija DNA fragmenta in plazmida z isto kombinacijo restrikcijskih endonukleaz, s čimer dobimo komplementarne konce med molekulama, kar je osnova za uspešno ligacijo. Prav tako pomembno je molarno razmerje med DNA fragmentom in plazmidom. Običajno razmerje med njima je 3 : 1. Maso fragmenta za ligacijo v plazmidni vektor smo izračunali z naslednjo enačbo:

$$m_{fragment} = \frac{m_{vektor} \cdot dolžina_{fragment}}{dolžina_{vektor}} \cdot 3 \qquad \dots (4)$$

Mase so bile podane v ng, dolžine pa v bp. Ligacijska mešanica je vsebovala 30–100 ng plazmidnega vektorja, izračunano količino DNA fragmenta/-ov, 4 μ l 5x ligaznega pufra, 1 μ l T4 DNA ligaze (5 Weiss U/ μ l) in MQ do končnega volumna 20 μ l. Ligacijsko mešanico smo inkubirali 20 min na sobni temperaturi, ji dodali 30 μ l MQ in nato 25 μ l transformirali v kompetentne celice *E. coli*.

3.2.3.7 Priprava kompetentnih celic

Celice *E. coli* smo iz trajne kulture precepili na trdno LB gojišče in inkubirali čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo posamezne kolonije precepili v 10 ml tekočega LB gojišča in jih čez noč stresali pri 37 °C in 160 obr/min (obratov na minuto). Eno od prekonočnih kultur smo naslednje jutro vcepili v sveže 100 ml LB gojišče tako, da je OD₆₀₀ znašal 0,05. Bakterijsko kulturo smo stresali pri 37 °C in 160 obr/min do OD₆₀₀ 0,5, nato smo jo 5 min hladili na ledu, prenesli v sterilno centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 4 °C in 4000 obr/min. Odstranili smo supernatant, celice pa resuspendirali v 30 ml predhodno ohlajenega TFB1 pufra. Celično suspenzijo smo inkubirali na ledu 90 min, jo ponovno centrifugirali 5 min pri 4 °C in 4000 obr/min in zavrgli supernatant. Celice smo resuspendirali v 8 mL TFB2 pufra in jih v 60 (ali 200) μ l alikvotih prenesli v sterilne mikrocentrifugirke, zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri –80 °C.

3.2.3.8 Transformacija kompetentih celic

Kompetentne bakterijske celice, shranjene na -80 °C, smo odtalili na ledu, jim dodali 25 µl ligacijske mešanice ali izbrano količino plazmidne DNA ter jih inkubirali na ledu 30 min. Celice smo transformirali s toplotnim šokom (pribl. 4 min pri 42 °C), po 2 min inkubaciji na ledu pa smo jim nato sterilno dodali 1 ml tekočega LB gojišča ter jih 1 uro stresali pri 500 obr/min in 37 °C. Zatem smo celice centrifugirali pri 7000 obr/min 3 min in odstranili supernatant. Zbrane celice smo resuspendirali v 100 µl tekočega LB gojišča in 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 poljubno število zraslih kolonij precepili v 10 ml tekočega LB gojišča z dodanim ustreznim antibiotikom in kulturo čez noč stresali pri 160 obr/min in 37 °C. Plazmidno DNA smo iz tekoče kulture izolirali s komercialno dostopnim kompletom GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) po navodilih proizvajalca. Postopek temelji na alkalni lizi celic, ločitvi plazmidne DNA od ostalih celičnih komponent (genomska DNA, proteini, lipidi ...) in njeni adsorpciji na silika membrano.

3.2.3.10 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA (izolirana plazmidna DNA, očiščeni restrikcijski fragmenti in DNA fragmenti po prileganju oligonukleotidov) smo izmerili na spektrofotometru NanoDrop 1000. Kvaliteto izolacije smo ocenili na podlagi razmerij A_{260}/A_{280} (merilo prisotnosti proteinov v izolatu) in A_{260}/A_{230} (merilo prisotnosti organskih spojin in kaotropnih soli v izolatu). Optimalno razmerje A_{260}/A_{280} za čisto DNA je 1,7–2,0.

3.2.3.11 Določanje nukleotidnega zaporedja

Plazmide z DNA konstrukti v končnem volumnu 15 µl s koncentracijo 50–100 µg/ml smo poslali na sekvenciranje v Nemčijo (Eurofins MWG Operon). Dobljena zaporedja smo primerjali s pričakovanimi s pomočjo spletnega orodja Evropskega inštituta za bioinformatiko (EBI) ClustalW2 (Larkin in sod., 2007).

3.2.3.12 Kloniranje po sistemu BioKock

Kloniranje po sistemu BioKock je leta 2003 predstavil Tom Knight iz MIT-jevega laboratorija za umetno inteligenco (Knight, 2003) in predstavlja enega izmed prvih poskusov standardizacije sestavljanja delov DNA (ang. »DNA parts«) v sintezni biologiji. Glavna lastnost te metode je strukturna idempotentnost. Z drugimi besedami: vsaka reakcija pusti za seboj ključne strukturne elemente nespremenjene, kar omogoča lažjo izmenjavo delov DNA in njihovo učinkovitejše sestavljanje v kompleksnejše biološke naprave.

Vsaka BioKocka je obdana z naborom standardnih restrikcijskih mest. Na 5' koncu so to EcoRI, NotI in XbaI, na 3' koncu pa SpeI, NotI in PstI. Medsebojna kompatibilnost XbaI in SpeI restrikcijskih mest omogoča enostavno ligacijo BioKocke pred ali za že obstoječo, pri čemer na mestu ligacije nastane mešano mesto, ki ga ne prepozna nobena restrikcijska endonukleaza. Na ta način lahko generiramo knjižnice medsebojno kompatibilnih in izmenljivih kompozitnih BioKock za načrtovanje sintetičnih bioloških sistemov.



Slika 45: Tritočkovna ligacija po sistemu BioKock (Shetty in sod., 2008: 5). S kloniranjem po sistemu BioKock lahko spojimo največ dve BioKocki hkrati. To dosežemo tako, da eno BioKocko režemo s kombinacijo restriktaz EcoRI in SpeI (A), drugo pa s kombinacijo XbaI in PstI (B). Destinacijski plazmidni vektor režemo z zunanjima encimoma EcoRI in PstI (C). Kompozitna BioKocka ima na mestu ligacije mešano mesto, vse strukturne elemente starševskih BioKock pa nedotaknjene.

Kljub začetnim velikim obetom te metode, danes sinteznemu biologu kloniranje po sistemu BioKock ne predstavlja več prve izbire, saj so se v zadnjem času pojavile mnoge časovno manj naporne in učinkovitejše alternative. Ob dejstvu, da cena sinteze DNA v zadnjih nekaj letih radikalno pada (trenutno okoli 0,35 €/bp oz. celo 0,01 €/bp pri velikih naročilih), pa so kloniranju v splošnem verjetno že šteti dnevi.

3.2.4 Delo s celično kulturo HEK293

3.2.4.1 Gojenje celične kulture

Človeško celično kulturo HEK293 smo gojili v posebnih posodicah, ki omogočajo pritrjanje celic na dno in njihovo rast v enosloju. Vzdrževali smo jih v kontroliralni atmosferi pri 95 % vlažnosti, 5 % CO₂ in 37 °C. Hranila in rastne faktorje so celice dobile z DMEM-om z 10 % (v/v) FBS, ki smo ga zamenjali približno vsake tri dni. Ko so celice prerasle okoli 90 % površine gojitvene posode, smo jih tripsinizirali z raztopino tripsina in EDTA ter presadili po ustaljenem postopku. Celice smo uporabljali do približno 20. pasaže. Pred nacepitvijo celic smo z napravo za avtomatsko štetje celic določili njihovo gostoto.

3.2.4.2 Prehodna transfekcija pritrjenih celic

Celice za transfekcijo s plazmidi za zaznavanje FRET-a smo nacepili v 8-luknjične mikroskopirne komore za celične kulture in sicer 5 x 10^4 celic na posamezno luknjico v 300 µl gojišča. Sledila je 24-urna inkubacija celic oziroma do 50–60 % preraščenosti, kar je optimalno za transfekcijo celic z jetPEITM reagentom. To je linearni polietilenimin, ki zapakira DNA v pozitivno nabite delce. Slednji po interakciji z anionskimi proteoglikani na površini celic vstopijo vanje z endocitozo. Mešanico plazmidne DNA, 150 mM NaCl in

jetPEITM reagenta smo pripravili po navodilih proizvajalca. Ustrezne količine (natančne vrednosti so navedene v poglavju 4.1.1.4.1) plazmidne DNA smo zmešali z raztopino 150 mM NaCl do 20 µl. Mešanico smo vorteksirali in ji dodali enak volumen jetPEITM reagenta (prav tako pripravljen kot mešanica s 150 mM NaCl). Po \approx 15 min inkubaciji pri sobni temperaturi smo transfekcijsko mešanico dodali celicam, ki smo jih nato pred pripravo za mikroskopiranje gojili še 12–24 ur.

3.2.5 Laserska konfokalna mikroskopija (LCSM)

Tehniko konfokalne mikroskopije je že leta 1957 patentiral Marvin Minsky (Minsky, 1957), do rutinske uporabe LCSM pa je po razvoju laserjev prišlo šele ob koncu 80. let 20. stoletja. Ključna prednost konfokalne mikroskopije pred svetlobno je v izključitvi odbite svetlobe iz ravnin pod in nad opazovano, kar vodi v boljšo optično ločljivost in kontrast mikrografa. Pred snemanjem z LCSM biološki material označimo s sintetičnimi fluorescenčnimi barvili ali fluorescenčnimi proteini, nato pa ga točko za točko vzbujamo z laserjem ustrezne valovne dolžine. Bistveni komponenti optičnega sistema LCSM sta dve zaslonki: prva zoži laserski žarek in s tem poveča ločljivost, druga pa iz vzbujane točke k detektorju (fotopomnoževalki) usmeri le fotone z določeno valovno dolžino.

S LCSM lahko s pregledovanjem posameznih optičnih rezin rekonstruiramo tudi visokoločljive 3D posnetke opazovanih fluorescenčno označenih mikroskopskih preparatov, uporabnost metode pa sega onkraj meja bioloških znanosti, saj je pomembna tudi v kemiji in vedah o materialih.

Vsi mikrografi v diplomskem delu so bili posneti z invertnim konfokalnim mikroskopom TCS5 SP5 podjetja Leica Microsystems s premično mizico. Za opazovanje mikroskopskih preparatov smo uporabili 63x oljni imerzijski objektiv z numerično aperturo 1,4.

3.2.5.1 Fiksacija celic s paraformaldehidom

Za izvedbo meritev FRET-a z metodo bledenja akceptorja smo morali celice najprej fiksirati s paraformaldehidom. 4 % raztopino paraformaldehida smo pripravili tako, da smo v 10 ml 1x PBS zatehtali 0,4 g paraformaldehida in to segrevali v vodni kopeli, dokler se ni ves prah raztopil. Celice, ki so rasle v komori za mikroskopiranje, smo najprej 3-krat sprali s 300 μ l 1x PBS, s čimer smo odstranili vso gojišče. Nato smo v vsak razdelek komore dali po 150 μ l 4 % raztopine paraformaldehida in celice inkubirali z njim 10 min. Zatem smo celice ponovno sprali, tokrat 2-krat s 300 μ l 1x PBS. Po spiranju smo v vsak razdelek komore odpipetirali 150 μ l 1x PBS, jo zavili v alufolijo in shranili pri 4 °C do mikroskopiranja.

3.2.5.2 Barvanje celičnih jeder z barvilom Hoechst 34580

Z barvanjem celičnih jeder smo želeli preveriti, ali proteini za FRET kolokalizirajo v jedru. Pritrjene transficirane celice smo pobarvali z barvilom Hoechst 34580 po navodilih proizvajalca. Celicam smo dodali 200 μ l raztopine barvila v 1x PBS s koncentracijo 1 μ g/ml in jih inkubirali 10 min. Po inkubaciji smo raztopino barvila odstranili, v jamice odpipetirali 150 μ l 1x PBS, mikroskopirno komoro pa zavili v alufolijo in jo shranili pri 4 °C do mikroskopiranja. Modro fluorescenčno barvilo se veže v mali žleb jedrne DNA in ima emisijski maksimum pri \approx 460 nm. Pobarvan preparat smo vzbujali z lasersko svetlobo v UV območju.

3.2.5.3 Merjenje FRET-a z metodo bledenja akceptorja

3.2.5.3.1 Teoretično ozadje metode

Fluorescenca donorja je dušena zaradi FRET-a, ki vzbuja akceptor. Z bledenjem akceptorskega fluorofora sprostimo to dušenje, kar vodi v povečano fluorescenco donorja. Za izvedbo teh eksperimentov je pomembno, da z bledenjem akceptorja ne zbledi tudi donor in da akceptorjeva fluorescenca pade na 10 % svoje začetne vrednosti. Oba pogoja zlahka zagotovimo s pomočjo laserskega konfokalnega mikroskopa. Učinkovitost FRET-a podamo z naslednjo enačbo:

$$FRET_{eff} = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}} \qquad \dots (5)$$

Enačba torej poda razmerje med razliko donorjevega signala po in pred bledenjem akceptorja in donorjevim signalom po bledenju akceptorja. Nekatere omejitve te metode so: ob bledenju akceptorja lahko zbledi tudi donor, izvedba je primerna le za fiksirane preparate, meritev lahko na enem mestu izvedemo le enkrat, akceptor je včasih težko uničiti.

3.2.5.3.2 Izvedba meritev

Na objektiv mikroskopa smo kanili kapljico imerzijskega olja, 8-luknjične mikroskopirne komore s fiksiranimi celicami pa postavili na premično mizico nad objektiv. Pred bledenjem akceptorja smo nastavili moč laserskega žarka, položaj dikroičnih zrcal, območji detekcije emitirane svetlobe (donorski in akceptorski kanal) in napetost na fotopomnoževalki. Za vzbujanje mCerulean in mCitrine smo uporabili 458 nm argonski laser. Donor (mCerulean) smo vzbujali z $\lambda_{ex} = 458$ nm, emisijsko okno smo nastavili na 470–510 nm. Akceptor (mCitrine) smo vzbujali z $\lambda_{ex} = 514$ nm, emisijsko okno smo nastavili na 525–580 nm. Meritve FRET-a na podlagi razloženega teoretičnega ozadja metode in kasnejšo obdelavo mikrografov smo izvedli z računalniškim programom Leica LAS AF Lite. Surove vrednosti meritev so predstavljene v prilogi B.

3.2.5.3.3 Statistična obdelava meritev

Postavili smo ničelno (H_0) in alternativno (H_A) domnevo, rezultate meritev FRET-a pri negativni kontroli in celicah s programsko DNA pa nato primerjali s *t*-testom, kjer smo upoštevali enostransko alternativno domnevo. Statistično obdelavo vrednosti smo izvedli z računalniškim programom Microsoft Excel 2010. Natančen opis je v poglavju 4.1.1.4.4.

3.2.6 Metode dela z rekombinantnimi proteini

3.2.6.1 Produkcija rekombinantnih proteinov

3.2.6.1.1 Transformacija in vcepljanje kultur v produkcijska gojišča

Plazmida pET41a(+) z DNA konstruktoma za BRET partnerja smo transformirali v sev *E. coli* BL21(DE3)pLysS, ki je primeren za čezmerno izražanje proteinov iz plazmidnih vektorjev s T7 promotorjem. Posamezne kolonije smo po prekonočni inkubaciji na trdnem LB gojišču precepili v 100 ml sterilnega tekočega LB gojišča z dodanim kanamicinom (50 mg/l) in jih stresali čez noč pri 160 obr/min in 37 °C. Naslednje jutro smo pomerili OD₆₀₀ prekonočne kulture in z njo nacepili produkcijsko gojišče do OD₆₀₀ 0,1–0,2 po naslednji enačbi:

$$V_{vcepek} = \frac{OD_{600,zač} \cdot V_{goj}}{OD_{600,prek}} \qquad \dots (6)$$

 V_{goj} označuje volumen produkcijskega gojišča (navadno 250 ali 500 ml v ustreznih erlenmajericah), $OD_{600,prek}$ optično gostoto prekonočne kulture pri 600 nm, $OD_{600,zač}$ pa začetno optično gostoto produkcijske kulture. Produkcijske kulture smo stresali pri 160 obr/min in 30 ali 37 °C.

3.2.6.1.2 Sestava produkcijskega gojišča

Za produkcijo rekombinantnih proteinov smo uporabili 2x YT gojišče z dodano glukozo, ZnCl₂ in kanamicinom (100 mg/l). Natančna sestava gojišča je opisana v preglednici 22.

3.2.6.1.3 Indukcija izražanja z IPTG in opis delovanja pET sistema

Celično rast smo spremljali z merjenjem optične gostote OD_{600} . Ko je slednja dosegla vrednost 0,7–0,9, smo izražanje proteinov inducirali z dodatkom IPTG v produkcijsko gojišče do končne koncentracije 1 mM. Celice smo pustili rasti 4 ure (produkcija pri 37 °C) ali 6 ur (produkcija pri 30 °C) po indukciji z IPTG.



Slika 46: pET sistem za čezmerno izražanje rekombinantnih proteinov (pET System ..., 2006). V genomu seva *E. coli* BL21(DE3)pLysS je zapis za T7 RNA polimerazo (v obliki λ DE3 profaga), katere izražanje kontrolira *lacUV5* promotor z *lac* operatorjem. Ko je produkt *lacI* (tetramerni *lac* represor oziroma LacI, katerega gen se nahaja v genomu *E. coli* in v pET vektorju) prisoten v celici, se veže na *lac* operator (slednji se nahaja tudi tik za T7 promotorjem v pET vektorju) in endogena RNA polimeraza ne more prepisati gena za T7 RNA polimerazo. Po dodatku IPTG *lac* represor oddisocira iz *lac* operatorskih mest in gen za T7 RNA polimerazo se lahko prepiše. Vezava T7 RNA polimeraze na T7 promotor sproži izražanje tarčnega rekombinantnega proteina. pLysS (plazmid z genom za odpornost proti kloramfenikolu; na sliki ni prikazan) nosi zapis za T7 lizocim, ki je naravni inhibitor T7 RNA polimeraze, kar še dodatno zmanjša puščanje T7 promotorja, ko celice niso inducirane.

3.2.6.1.4 Žetje in liza celic

Po končani produkciji smo gojišče prelili v 500 ml centrifugirke, jih uravnotežili na tehtnici in celice zbrali z 10 min centrifugiranjem pri 4 °C in 5500 obr/min. Supernatant smo odlili, celičnemu peletu pa dodali lizni pufer (2 ml za vsakih 100 ml produkcijske kulture). Celice smo lizirali 30 min na ledu.

3.2.6.1.5 Razbijanje celic z ultrazvokom

Celice smo razbili z ultrazvočno napravo. Lizat smo najprej prelili v 50 ml falkonko ali stekleno čašo, ki sta bili ves čas na ledu. Razbijanje celic z ultrazvokom je potekalo 20 min. V tem času sta si v 1 sek intervalih izmenično sledila razbijanje z ultrazvokom in premor. Amplitudo ultrazvočne naprave smo nastavili na 33 %. Celični lizat po obdelavi z ultrazvokom ni bil več viskozen.

3.2.6.1.6 Centrifugiranje

Z ultrazvokom obdelan celični lizat smo prenesli v čiste centrifugirke in ga centrifugirali 20 min pri 12000 obr/min in 4 °C. Supernatant smo prelili v nove centrifugirke, pelet z inkluzijskimi telesci pa 1x sprali s 5 ml liznega pufra in še 2x s 5 ml 20 mM Tris-HCl s pH 8,0. Po vsakem spiranju je sledilo 20 min centrifugiranje pri 12000 obr/min in 4 °C. Pred hrambo supernatanta in inkluzijskih telesc pri -20 °C smo vzeli alikvot materiala za oceno izražanja proteinov z barvanjem s Commassie modrim in Western prenosom.

3.2.6.2 Ocena izražanja rekombinantnih proteinov

3.2.6.2.1 Vlivanje SDS-PAGE gelov

V ogrodje sistema za vlivanje gelov smo vpeli stekelci, ločeni z 1,0 mm špranjo, ter mednje vlili 10 % ločitveni gel (pregl. 27) prek katerega smo nanesli 200 µl izopropanola. Gel smo pustili polimerizirati 1 uro, nato pa odlili izopropanol, njegove ostanke pa odstranili s filter papirjem, ki smo ga vstavili med obe stekelci. Prek strjeni ločitveni gel smo vlili 4 % vstopni gel (pregl. 28), kamor smo potopili glavniček, ki je po polimerizaciji (30 min) pustil na svojem mestu žepke za nanos proteinskih vzorcev. Pripravljen gel smo ali takoj uporabili ali pa ga zavitega v omočeno brisačo in alufolijo shranili pri 4 °C. Pri pripravi gelov je pomemben vrstni red dodajanja posameznih sestavin.

Preglednica 27: Sestava 10 % ločitvenega SDS-PAGE gela (za 2 gela).

Sestavina gela	Volumen
MQ	4,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl
30 % (w/v) akrilamid/bis	3,3 ml
10 % (w/v) APS	50 µl
TEMED	5 µl

Preglednica 28: Sestava 4 % vstopnega SDS-PAGE gela (za 2 gela).

Sestavina gela	Volumen	
MQ	3,05 ml	
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	
10 % (w/v) SDS	50 µl	
30 % akrilamid/bis	0,665 ml	
10 % APS	25 µl	
TEMED	5 µl	

3.2.6.2.2 Priprava vzorcev za SDS-PAGE

Iz supernatanta in resuspendiranih inkuzijskih teles smo odpipetirali 36 μ l materiala, ga redčili z isto količino MQ in dodali 24 μ l 4x nanašalnega pufra z SDS in reducentom (β -merkaptoetanol). Slednji reducira stabilizirajoče disulfidne mostičke v proteinu, medtem ko SDS obda protein z negativnim nabojem, s čimer je ločevanje proteinov z SDS-PAGE neodvisno od njihovega naboja, temveč poteče na podlagi razlik v njihovih velikostih. Tako pripravljene vzorce smo toplotno denaturirali 10 min pri 95 °C v napravi za verižno reakcijo s polimerazo, nato pa jih centrifugirali 1 min pri 13400 obr/min.

3.2.6.2.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE smo izvajali z uporabo vertikalnega sistema Mini-PROTEAN[®] II (Biorad). Sestavili smo ga po navodilih proizvajalca. Pri tej metodi po nanosu vzorcev na gel sistem izpostavimo električni napetosti, zaradi česar negativno nabiti proteini potujejo proti pozitivni elektrodi (anodi). Vzorci v vstopnem gelu se najprej zberejo v isto ravnino in nato vstopijo v ločitveni gel. Večji kot je protein, težje potuje skozi gel. Poleg proteinskih vzorcev smo v žepke na gelu nanesli tudi 6 µl velikostnega proteinskega standarda (PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus). Za barvanje proteinov z barvilom Commassie modro smo v žepek običajno nanesli 16 µl pripravljenega vzorca, za Western prenos pa 8 µl. SDS-PAGE je potekal v 1x SDS elektroforeznem pufru 1 uro pri stalni napetosti 200 V. Elektroforezo smo ustavili, ko je barvilo bromfenol modro, ki je prisotno v nanašalnem pufru, pripotovalo do spodnjega roba ločevalnega gela.

3.2.6.2.4 Barvanje proteinov z barvilom Commassie modrim

Po končani elektroforezi smo gel sprali z MQ in ga pobarvali z barvilom Commassie modrim, ki se veže na bazične (arginin, lizin, histidin) in aromatske (triptofan, fenilalanin, tirozin) aminokislinske ostanke v proteinu, k vezavi pa prispevajo tudi Van der Waalsove interakcije. Commasie modro smo pred uporabo redčili z 20 % ocetno kislino v razmerju 1:1. Gel smo ob rahlem stresanju (50 obr/min) na sobni temperaturi barvali 30 min, potem pa ozadje razbarvali z mešanico 30 % etanola in 10 % ocetne kisline. Med razbarvanjem smo mešanico v kadički z gelom, zaradi nastalega ravnotežja med koncentracijama barvila v gelu in raztopini, večkrat zamenjali s svežo.

3.2.6.2.5 Western prenos

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ in ga namočili v pufru za mokri prenos, kamor smo položili tudi HybondTM ECL nitrocelulozno membrano (z 0,45 μ m porami), filtrirni papir in blazinice. Enoto za mokri prenos smo sestavili v naslednjem zaporedju:

- blazinica
- filtrirni papir
- poliakrilamidni gel
- nitrocelulozna membrana
- filtrirni papir
- blazinica

Nitrocelulozna membrana je bila obrnjena proti pozitivni elektrodi (anodi). Sestavljeno kaseto smo vstavili v celico za Western prenos in jo do roba napolnili s pufrom za Western prenos ohlajenim na 4 °C. V celico smo postavili tudi hladilno enoto (plastična posoda z ledom), s čimer smo preprečili pregrevanje pufra med prenosom, ki je sicer trajal 90 min pri stalnem električnem toku 350 mA in mešanju z magnetnim mešalom. Po 45 min smo hladilno enoto zamenjali z svežo. Po prenosu smo nitrocelulozno membrano čez noč blokirali v pufru za spiranje (1x TBS z 0,1 % Tween-20, pH 7,4) s 5 % (w/v) nemastnega mleka v prahu. Raztopino protiteles (velja tako za primarna kot sekundarna protitelesa) smo pripravili v pufru za spiranje z 1 % (w/v) nemastnega mleka v prahu. Membrano z

1:2000 redčenimi primarnimi protitelesi smo zapakirali v plastično vrečko in jo stresali 90 min pri 150 obr/min. Zatem smo s pufrom za spiranje 4-krat 5 min spirali membrano, s čimer smo se znebili presežnih primarnih protiteles. Sledila je inkubacija membrane s 6 ml raztopine 1:3000 redčenih sekundarnih protiteles označenih s hrenovo peroksidazo (HRP), tokrat 45 min pri 150 obr/min. Membrano smo nato 3-krat 5 min spirali s pufrom za spiranje. Za detekcijo proteinov smo uporabili ECL reagent (AmershamTM ECLTM detekcijski reagent za Western prenos). Tik pred uporabo smo svežega pripravili v mikrocentrifugirki po navodilih proizvajalca in sicer tako, da smo reagent 1 in reagent 2 zmešali v razmerju 1 : 1. Tako nastali susbstrat za hrenovo peroksidazo smo nakapljali na stekleno ploščo in nanjo položili membrano s stranjo s proteini obrnjeno proti steklu. Membrano smo tako inkubirali 5 min, nato pa jo fotografirali z napravo za slikanje membran Syngene G:BOX. Običajno smo svetlobo kot posledico kemoluminiscence zajemali v 10 intervalih po 40 sek, pri čemer se je signal po vsakem intervalu seštel s prejšnjim.

Detekcija proteinov temelji na ojačani kemoluminiscenci. Eden od reagentov vsebuje vodikov peroksid, drugi pa ojačevalec in ciklični diacilhidrazid luminol. Hrenova peroksidaza konjugirana s sekundarnim protitelesom katalizira oksidacijo luminola, s čimer ga vzbudi. Oksidiran luminol ob vračanju v osnovno stanje sprosti foton z valovno dolžino 428 nm. Ojačevalci so razne fenolne spojine, ki jakost signala povečajo do 1000-krat.

3.2.6.3 Ni-NTA kelatna kromatografija za izolacijo proteinov pod nativnimi pogoji

Producirali, izolirali in okarakterizirali smo dva fuzijska proteina:

- MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis
- MBP-RLuc-2C7-8xHis

Za uspešno izolacijo obeh rekombinantnih proteinov smo morali poznati njune osnovne lastnosti (pregl. 29). Nukleotidni zaporedji obeh odprtih bralnih okvirjev smo s pomočjo programskega orodja Vector NTI 11.0 (Invitrogen) prevedli v aminokislinski zaporedji. Pri analizi fuzijskih proteinov smo si pomagali s spletnim bioinformacijskim orodjem ProtParam (Gasteiger in sod., 2005).

Protein	Število aminokislin	Velikost [kDa]	pI	$\epsilon [M^{-1} cm^{-1}]$	Abs _{0,1%} *
MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	813	90,4	6,58	100160	1,108
MBP-RLuc-2C7-8xHis	897	101,5	7,62	134190	1,322

Preglednica 29: Lastnosti obeh fuzijskih proteinov na osnovi analize s spletnim orodjem ProtParam.

^{*}Abs_{0,1%} ustreza absorbanci proteina pri 280 nm, če bi ga imeli v koncentraciji 1 mg/ml (kar je 0,1 % raztopina proteina). ε (molarni ekstinkcijski koeficient) je intrinzična lastnost proteina, ki pomeni absorbanco 1M raztopine proteina pri 280 nm, kar pa je v praksi nemogoče doseči, zato je bolj uporabna vrednost Abs_{0,1%}. V tabeli so vrednosti Abs_{0,1%} (kakor tudi vrednosti ε) podane za protein z reduciranimi cistini. Med obema količinama velja naslednja zveza:

$$Abs_{0,1\%} = \frac{\varepsilon_{molarni}}{M_{w,protein}} \qquad \dots (7)$$

3.2.6.3.1 Priprava kolone

Plastično kolono smo napolnili z Ni-NTA agarozo (Ni-NTA je vezana na sefarozo CL-6B) s kapaciteto vezave 5–10 mg/ml in shranjeno v 20 % (v/v) etanolu tako, da se je posedlo približno 3 ml polnila. Pred vsako uporabo (tudi, če smo jo uporabili prvič) smo kolono regenerirali. To smo izvedli v štirih korakih: najprej smo čez kolono spustili etanol, v katerem se je nahajalo polnilo, nato smo jo sprali z regeneracijskim pufrom v količini 5 volumnov kolone (1 volumen kolone ustreza 3 ml), sledilo je spiranje z večjimi količinami MQ (vsaj 10 volumnov kolone), nazadnje pa smo kolono uravnotežili še z vezalnim pufrom, ki je bil po sestavi zelo podoben liznemu pufru (pregl. 12), s čimer smo zagotovili optimalne pogoje za kelacijo proteina z Ni²⁺. Supernatant s proteinom smo pred nanosom na kolono centrifugirali 30 min pri 12000 obr/min. Po zaprtju kolone na spodnji strani smo nanjo nanesli približno 6 ml supernatanta. Obe strani kolone smo nato tesno oblepili s parafilmom, jo rahlo premešali, nato pa jo ob rahlem stresanju inkubirali najmanj 1 uro ali pa čez noč pri 4 °C.

Kolono smo regenerirali tudi po zaključku izolacije in jo do naslednje uporabe (za izolacijo enakega proteina) shranili v 20 % etanolu (v/v) pri 4 °C.

3.2.6.3.2 Spiranje in elucija

Sledilo je spiranje vezanih proteinov, ki temelji na kompeticiji imidazola s histidini v vezanem proteinu za vezavo na Ni-NTA (sl. 47). S postopnim večanjem koncentracije imidazola v spiralnih pufrih se najprej znebimo nespecifično vezanih nečistoč na koloni, nato pa (običajno pri višjih koncentracijah imidazola) eluiramo še tarčni protein.



Slika 47: Interakcije pri izolaciji proteina z Ni-NTA kelatno kromatografijo (Knecht in sod., 2009: 277). Visoka afiniteta Ni²⁺ za NTA omogoča milo elucijo proteina pri zmernih koncentracijah imidazola. K_D imidazola je ravno dovolj nizka, da še lahko tekmuje s heksahistidinskimi oznakami v vezanem proteinu, ni pa dovolj nizka, da bi povzročila disociacijo Ni²⁺. To lahko dosežemo z dodajanjem EDTA v elucijski pufer.

Najprej smo v 15 ml falkonko zbrali nevezano frakcijo. Kolono smo nato spirali z pufrom W1 (vseboval je 20 mM imidazol) in spremljali A_{280} , dokler ta ni padla pod 0,02. Dobro spiranje kolone v tem koraku izolacije je ključno za kasnejšo elucijo čistega proteina. Sledilo je spiranje s pufri W2, W3 in E. Po vsaki menjavi pufra smo v 50 ml falkonki zbrali približno 20 ml, nato pa kolono sprali do A_{280} 0,02, enako kot v prvem koraku izolacije. Vse pufre (W1, W2, W3 in E) smo na kolono nanašali po 4–5 ml. Pri postopku izolacije je pomembno izpostaviti dejstvo, da so vsi pufri vsebovali reducent (DTT), ki je zagotavljal redukcijo tiolnih skupin obeh cisteinov v cinkovih prstih. Ta dva cisteinska ostanka skupaj z dvema histidinskima koordinirata Zn²⁺ ion in s tem stabilizirata strukturo cinkovega prsta. V pufrih prisoten cinkov klorid je predstavljal vir Zn²⁺ ionov. Prisotnost proteinov v imidazolnih frakcijah smo preverili na SDS-PAGE gelih barvanih s Commassie modrim.

3.2.6.3.3 Dializa

Z dializo, ki temelji na principu pasivne difuzije, protein izpostavimo kemijskemu okolju, v katerem želimo z njim izvesti nadaljnje eksperimente. Po analizi zbranih frakcij smo tiste, ki so vsebovale čist protein, dializirali proti dializnemu pufru, ki je vseboval iste sestavine kot spiralni, z izjemo imidazola (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 100 μ M ZnCl₂, 1 mM DTT, pH 8,0). Za dializo smo uporabili dializno črevo Spectra/Por[®] (pore z MWCO 3500, 24 mm). Pred uporabo smo ga približno 1 uro namakali v MQ ter s puhalko z MQ intenzivno sprali tudi njegovo notranjost. Vzorce za dializo smo s stiščki zatesnili v tako pripravljenem dializnem črevesu in jih dali v posodo z 2 litroma dializnega pufra. Dializa je potekala čez noč pri 4 °C ob mešanju z magnetnim mešalom. Po dializi smo dializno črevo ponovno sprali z MQ, nato pa ga shranili v 20 % (v/v) etanolu do naslednje uporabe (za dializo enakega proteina). Dializirane proteine smo shranili v 30–50 % glicerolu pri -20 °C. Glicerol deluje kot krioprotektant, saj preprečuje agregacijo proteinov pri prehajanju med trdnim in tekočim agregatnim stanjem.

3.2.6.3.4 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov z merjenjem A₂₈₀

Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm je v veliki meri odvisno od prisotnosti aromatskih aminokislin triptofana in tirozina v proteinu (prav tako cistinov). Na osnovi njihovih ekstinkcijskih koeficientov pri valovni dolžini 280 nm je mogoče določiti ekstinkcijski koeficient celotnega proteina pri tej valovni dolžini, odtod pa absorbanco 0,1 % raztopine proteina kot je opisano v komentarju k preglednici 29. Na podlagi teh povezav med količinami smo masno koncentracijo proteinov določili z naslednjo enačbo:

$$\gamma_{protein} = \frac{A_{280,izmerjena}}{A_{0,1\%}} \qquad \dots (8)$$

 $A_{280,izmerjena}$ je absorbanca raztopine proteina, ki smo jo izmerili s spektrofotometrom, $A_{0,1\%}$ pa je teoretična absobanca 0,1 % raztopine proteina, ki smo jo dobili s programom ProtParam.

Za slepo probo smo pred merjenjem koncentracij proteinov uporabili dializni pufer. Iz masnih koncentracij (γ) smo izračunali še množinske (c).

3.2.6.4 Karakterizacija fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis

3.2.6.4.1 Cirkularni dikroizem (CD)

Cirkularni dikroizem je spektroskopska tehnika, ki temelji na različni absorpciji levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe v preučevanem optično aktivnem vzorcu. Različno cirkularno polarizirana žarka imata ob prehodu skozi vzorec različni hitrosti, odtod tudi različni valovni dolžini, prav tako pa se razlikujeta po stopnji absorpcije v vzorcu. Razliko med molarnima ekstinkcijskima keoficientoma obeh žarkov imenujemo cirkularni dikroizem, kar zapišemo z enačbo spodaj.

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D = \frac{A_L}{c \cdot l} - \frac{A_D}{c \cdot l} = \frac{A_L - A_D}{c \cdot l} \qquad \dots (9)$$

 A_L in A_D sta absorbanci levo in desno cirkularno polarizirane svetlobe, c predstavlja množinsko koncentracijo vzorca, l pa dolžino poti žarka.

Med merjenjem CD spektra vzorec izmenično osvetljujemo z obema žarkoma v izbranem okviru valovnih dolžin. CD v daljnjem UV-spektru ($\approx 185-240$ nm) se uporablja za oceno deležev sekundarnih struktur proteina (sl. 48). Večina modernih CD spektroskopov vrednosti prikaže v obliki eliptičnosti v mdeg, ki jih lahko s preprosto enačbo pretvorimo v povprečne molarne eliptičnosti podane na AK ostanek pri vsaki od valovnih dolžin.

$$\theta_{MRE} = \frac{0.1 \cdot \theta_{mer} \cdot MRW}{\gamma \cdot l}; MRW = \frac{M_{W, prot}}{N - 1} \qquad \dots (10)$$

 θ_{MRE} je povprečna molarna eliptičnost podana na AK ostanek; θ_{mer} je eliptičnost, ki jo izmeri naprava (v mdeg); γ je masna koncentracija proteina (v mg/ml); l je dolžina poti žarka (v cm); *MRW* pa povprečna molekulska masa aminokisline v proteinu (količnik molekulske mase proteina in števila peptidnih vezi v njem).

Takšna normalizacija omogoča primerjavo med različno velikimi proteini, prav tako pa so tako predstavljeni rezultati neodvisni od koncentracije proteina ter od dolžine poti žarka, torej od kivete, ki smo jo uporabili za meritev. Tudi v literaturi je to najpogostejši prikaz CD spektra.



Slika 48: Značilni CD spektri sekundarnih struktur proteina.

CD spekter fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (pred merjenjem smo ga centrifugirali 10 min pri 4 °C in 12000 obr/min) shranjenega v dializnem pufru s koncentracijo 0,28 mg/ml smo izmerili 3-krat s spektrofotometrom Chirascan CD. Optična pot žarka je znašala 0,1 cm, bazna linija (dializni pufer) je bila avtomatsko odšteta od izmerjenih vrednosti, snemanje spektra pa je potekalo pri koraku 1 nm/sek med 200 in 260 nm. Dobljene krivulje smo s pomočjo priloženega programskega orodja povprečili (pril. D), dobljen graf pa zgladili s filtrom za glajenje Savitzky-Golay (Savitzky in Golay, 1964) in ga togo premaknili, s čimer smo y vrednosti pri valovnih dolžinah $\approx 250-260$ nm poravnali na 0 (sl. 66). Vrednosti nezglajenih ali zglajenih povprečij smo pretvorili v θ_{MRE} (enačba 10, prilogi E in F) in jih uporabili za analizo sekundarne strukture proteina s spletnim programskim orodjem K2d oziroma za izris grafa.

3.2.6.4.2 Ocena deležev α -vijačnic in β -struktur s programom K2d

K2d je spletno programsko orodje za oceno deležev sekundarnih struktur proteina na osnovi θ_{MRE} vrednosti. Programski algoritem temelji na Kohonenovi nevronski mreži (Andrade in sod., 1993), kot vhodni nabor podatkov pa program zahteva vrednosti 10^{-3} x θ_{MRE} in sicer v obsegu 200–240 nm. Poleg ocene deležev sekundarnih struktur program vrne tudi podatek, ali je ta tudi zanesljiva.

Vrednosti nezglajenih povprečij (torej surove podatke, pril. E) smo vnesli v program, ki nam je predvidel deleže posameznih sekundarnih struktur (α -vijačnica, β -struktura, naključna struktura). Le-te smo primerjali s teoretičnimi deleži, ki smo jih dobili na osnovi že znanih 3D struktur proteinov v fuziji (pril. G).

3.2.6.4.3 Določanje hidrodinamskega radija proteina z DLS

Dinamično sipanje svetlobe je fizikalna metoda, s katero lahko ugotovimo, kakšna je velikostna porazdelitev delcev v suspenziji ali polimerov v raztopini. Svetlobo v obliki laserskega žarka pošljemo skozi vzorec. Ko zadane delce v vzorcu, se z Rayleighevim sipanjem razprši v vse smeri, intenziteta sipane svetlobe pa je odvisna tudi od tipa interference (konstruktivna ali destruktivna) s sipano svetlobo sosednjih delcev. Ker so delci v raztopini neprestano podvrženi naključnim medsebojnim interakcijam in posledično naključnemu ali Brownovemu gibanju, se s časom spreminjajo razdalje med njimi, posledično pa tudi intenziteta sipane svetlobe. Iz časovno odvisnih fluktuacij intenzitete sipane svetlobe in če dogajanje v vzorcu posnamemo v dovolj kratkih časovnih intervalih (npr. 100 µsec), lahko določimo velikostno porazdelitev delcev.

Meritve smo izvedli z napravo Malvern Zetasizer Nano HT. Le-ta zazna sipano svetlobo pod različnimi koti, na podlagi sprememb v njeni intenziteti pa lahko določimo hidrodinamski radij delcev v vzorcu. Protein v dializnem pufru smo pred meritvijo centrifugirali 10 min pri 4 °C in 12000 obr/min, s čimer smo se znebili večjih agregatov in morebitnih prašnih delcev, ki bi sicer motili meritve. Opravili smo tri neodvisne meritve.

3.2.6.4.4 Merjenje fluorescence

S PerkinElmer LS55 fluorescenčnim spektrometrom smo posneli emisijski spekter supernatanta, iz katerega smo kasneje izolirali protein. Vzorec smo vzbujali s svetlobo valovne dolžine 485 nm, pri čemer je napetost na fotopomnoževalki znašala 700 V, emisijski spekter supernatanta pa smo posneli med 500 in 600 nm pri hitrosti snemanja 100 nm/min.

3.2.6.4.5 Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA)

EMSA je priljubljena in pogosto uporabljana metoda za študij interakcij proteinov z DNA (ali RNA). Pri njej izkoristimo dejstvo, da kompleks proteina z DNA (RNA) v gelskem matriksu (bodisi agaroznem bodisi poliakrilamidnem) potuje počasneje od obeh posameznih sestavin kompleksa, kar na gelu opazimo kot zamik v potovanju.

Test smo izvedli na agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom. Pri tem načinu izvedbe metode pričakujemo zamik signala DNA tarče kot posledico vezave proteina

nanjo. Za DNA tarče smo uporabili vezalne oligonukleotide, ki so sestavni del DNA origamija. Ti oligonukleotidi po temperaturnem prileganju tvorijo zanke, ki vsebujejo vezalno zaporedje za domeno iz 6 cinkovih prstov AZPA4. Pričakovali smo vezavo proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis na takšne DNA tarče in zamik potovanja nastalih kompleksov.



Slika 49: Tipi vezalnih oligonukleotidov. Arhitektura vseh treh tipov (A, B in C) vezalnih oligonukleotidov. Takšno strukturo zavzamejo tudi po prileganju DNA origamija.

Lastna oznaka	Opis	Nukleotidno zaporedje*	
α	tip A, veže AZPA4	5'gagtccacctggccctgagagagtcccgctttttttggttgg	
β	tip B, veže AZPA4	5' actacga agatttgtttttgggtgcttttgggtgctcttttgagcacccaaagcacccaattcatcgccatcttgac3'	
γ	tip C, veže AZPA4	$5'a caacgg agg caccatt a {\tt gcacccaatttttt} ttgg {\tt gcfctttggg tgctcttttgag cacccaattctaa a a cgaca a caa a 3' a caacgg agg caccaattctaa a cgaca a caa a 3' a caacgg agg caccaattctaa a cgaca a caa a 3' a caacgg agg caccaattctaa a cgaca a caa a 3' a caacgg agg caccaattctaa a cgaca a caa a 3' a caacgg agg caccaattctaa a caacgaca a caacga a caac$	
3	tip A, negativna kontrola (veže 6F6)	5' gategggcggtaatgagatttttatetcattaccgcccgatettagaaccggagatggtttaatttccaactaat3'	

Preglednica 30: Vezalni oligonukleotidi uporabljeni za test zamika elektroforezne mobilnosti.

*z modro so odebeljeni nukleotidi, ki po prileganju zvorijo zanko z vezalnim mestom za AZPA4 oziroma 6F6



Slika 50: Napoved sekundarnih struktur vezalnih oligonukleotidov. Narejeno s spletnim programom OligoAnalyzer (IDT, Integrated DNA Technologies). Z modro so označena vezalna mesta za DiCP. Neoznačeni deli oligonukleotidov so pomembni za integracijo vezalnih mest v DNA origami. (a) α : vezalni oligonukleotid tipa A za vezavo AZPA4 (82 nt), β : vezalni oligonukleotid tipa B za vezavo AZPA4 (76 nt), γ : vezalni oligonukleotid tipa C za vezavo AZPA4 (80 nt; črtkane črte pomenijo, da gre za sklenjeno DNA vijačnico, kot je to shematično pokazano na sliki 49). (b) ϵ : vezalni oligonukleotid za vezavo 6F6 (74 nt).

Vezalne oligonukleotide smo prilegali po standardnem postopku. Poleg vseh treh z vezalnim mestom za AZPA4 smo v eksperiment vključili tudi negativno kontrolo. To je bil vezalni oligonukleotid tipa A, ki veže ortogonalno domeno iz 6 cinkovih prstov 6F6. Prav tako smo na gel nanesli vzorce samega proteina (v vseh koncentracijah) brez DNA tarč. Vzorce vezalnih oligonukleotidov in proteina smo pripravili v končnem volumnu 25 µl.

Končna koncentracija DNA tarče je bila 0,27 μ M, medtem ko smo protein dodajali v 2kratnem (0,53 μ M), 4-kratnem (1,07 μ M), 6-kratnem (1,6 μ M), 8-kratnem (2,13 μ M) in 10-kratnem (2,67 μ M) molarnem presežku. Vzorce smo do 25 μ l napolnili s pufrom za EMSO s sveže dodanim DTT-jem tik pred začetkom inkubacije, ki je trajala 1 uro na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce nanesli na 0,6 % agarozni gel. Elektroforeza je tekla 50 min pri 70 V v 1x TAE pufru. Po 50 min smo gel fotografirali pod UV lučjo.

3.2.6.4.6 Kvalitativni test z UV lučjo

Različne frakcije izoliranega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (s 50, 100 in 250 mM imidazola) smo osvetlili z UV transiluminatorjem Biometra Ti 3 in jih primerjali z izoliranim proteinom brez fluorescenčnih lastnosti.

Nato smo po 100 μ l 100 mM imidazolne frakcije izoliranega proteina v vzorcu besede »YFP« odpipetirali v belo mikrotitrsko ploščo s prozornim dnom, ki smo jo fotografirali pod UV lučjo z napravo za slikanje agaroznih DNA gelov DNR Bio-Imaging Systems.

3.2.6.5 Karakterizacija fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis

3.2.6.5.1 Luciferazni test

2x luciferazni pufer smo z MQ redčili do 1x in mu dodali 150 μ l v metanolu raztopljenega substrata za *Renilla* luciferazo (koelenterazin h). Nato smo po 40 μ l supernatanta proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis (neredčen ter 2-krat in 5-krat redčen, vsak v treh paralelkah) odpipetirali v belo mikrotitrsko ploščo. Bioluminiscenco vzorcev smo po standardnem postopku za merjenje luciferazne aktivnosti izmerili z Berthold's ORION II luminometrom za mikrotitrske plošče. Med postopkom merjenja je naprava v vsako luknjico dodala 100 μ l substrata in po 1 sek zabeležila izmerjeno vrednost v RLU (ang. »Relative Luminescence Unit«).

3.2.6.5.2 Kvalitativni test z G:BOX

Po 100 μ l supernatanta proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis smo v vzorcu besede »Luc« odpipetirali v belo mikrotitrsko ploščo. Po dodatku 100 μ l substrata koelenterazina h, pripravljenega na enak način kot za luciferazni test, smo luminiscenco supernatanta zaznali in fotografirali z napravo Syngene G:BOX, ki se sicer uporablja za kemiluminscenčno detekcijo proteinov po Western prenosu. Čas zajemanja bioluminiscence smo nastavili na 250 ms.

3.2.7 Metode dela s karotenoidi

3.2.7.1 Mikrobna produkcija likopena, β-karotena in zeaksantina

Kompetentne celice *E. coli* DH5 α ali BW27783 s programsko DNA smo transformirali s plazmidi za posamezni karotenoidni operon in jih razmazali na plošče z dodanima kloramfenikolom (odpornost nanj je nosil plazmid s karotenoidnim operonom) in kanamicinom (odpornost nanj je nosil plazmid s programsko DNA ali pa kontrolni plazmid). Kolonije smo precepili v 10 ml LB gojišča z dodanima ustreznima antibiotikoma in jih stresali čez noč pri 160 obr/min in 37 °C. Naslednje jutro smo produkcijska gojiša (500 ml erlenmajerice s 100 ml LB gojišča) s kloramfenikolom ($\gamma = 35$ mg/l) in

kanamicinom ($\gamma = 50 \text{ mg/l}$) nacepili s prekonočnimi kulturami do OD₆₀₀ 0,1 in jih stresali pri 160 obr/min in 30 °C. Produkcijskim kulturam smo po približno dveh urah dodali arabinozo do končne koncentracije 0,01 % (w/v), s čimer smo inducirali izražanje encimov karotenoidne biosintezne poti. Po indukciji so kulture rasle še ≈ 8 ur, zatem pa smo izvedli ekstrakcijo in primerjali končne titre biosinteznih produktov kultur s programsko DNA s kontrolnimi.

3.2.7.2 Ekstrakcija karotenoidov iz celic

V splošnem je mikrobne karotenoide težko ekstrahirati (Kaiser in sod., 2007). Metodo ekstrakcije smo najprej optimizirali (pril. H). 3 ml produkcijske bakterijske kulture smo 5 min centrifugirali pri 5000 obr/min. Supernatant smo odlili, zbrane celice pa resuspendirali v 3 ml 20 % SDS in jih 5 min vorteksirali ter pustili stati še 5 min. Nato smo suspenziji celic in SDS-a dodali 3 ml etilacetata in to mešanico vorteksirali 5 min. Sledilo je 5 min centrifugiranje pri 5000 obr/min, po čemer sta se vodna in organska faza ločili. Karotenoidi so se po ekstrakciji nahajali v etilacetatni fazi in v tej obliki smo jih tudi analizirali s HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti).

3.2.7.3 Analitske metode za določitev identitete spojin

3.2.7.3.1 Spektrofotometrija

Absorpcijske spektre ekstrahiranih karotenoidov smo pomerili s spektrofotometrom HP 8452A. Za slepi vzorec smo uporabili etilacetat, vse meritve pa izvedli v kvarčni kiveti.

3.2.7.3.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Ekstrakte s karotenoidi smo odpipetirali v 1,5 ml viale z 200 µl inserti in jih analizirali s pomočjo HPLC sistema Surveyor (Thermo Finnigan, San Jose, Kalifornija, ZDA), ki je bil opremljen s kvarterno črpalko, avtomatskim vzorčevalnikom s 100 µl zanko in PDA detektorjem s pretočno celico, ki je imela 50 mm optične poti. HPLC sistem je bil povezan z računalniškim programom ChromQuest 4.2, s pomočjo katerega smo dobljene kromatograme dokumentirali in jih ovrednotili. Iz standardnih raztopin smo dobili umeritveni krivulji likopena in β-karotena, ki so služile kvantifikaciji spojin v produkcijskih kulturah.

3.2.7.3.2.1 Obdelava HPLC meritev

Za ekstrakcijo smo uporabili 3 ml produkcijske kulture, ki smo jo po centrifugiranju resuspendirali v 3 ml 20 % SDS, odkoder smo karotenoide ekstrahirali v 3 ml etilacetata. To pomeni, da je koncentracija karotenoidov v etilacetatu predstavljala tisto v kulturi in nam torej pri izračunu ni bilo potrebno upoštevati faktorjev redčitev. Koncentracije karotenoidov smo iz vrednosti, ki so ustrezale kromatogramu vzorca, izračunali na podlagi umeritvene krivulje in jih normalizirali na OD₆₀₀ produkcijskih kultur. Rezultate smo podali v obliki masnih koncentracij normaliziranih na optično gostoto kultur z enoto $\frac{mg}{l \cdot OD_{600}}$.

4 REZULTATI

4.1 ZAZNAVANJE FRET-A NA PROGRAMSKI DNA

4.1.1 Priprava DNA konstruktov

4.1.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov

DNA konstrukti s fluorescenčnimi proteini so bili pripravljeni z osnovnimi metodami molekulskega kloniranja (po sistemu BioKock) in vstavljeni v plazmidni vektor pSB1AK8 med CMV promotor in sesalski terminator (natančneje med XbaI in PstI restrikcijski mesti). Clontech-ov plazmid C1 z genom za turkizni fluorescenčni protein (mCerulean) pod CMV promotorjem smo vzeli iz laboratorijske zbirke plazmidov. Odločitev, kje razdeliti oba fluorescenčna proteina na dva dela, je temeljila na delu Hu in Kerppola (2003). Avtorja ugotavljata, da je za rekonstitucijo fluorescenčnega proteina v sesalskih celicah optimalna naslednja cepitev proteina: aminokisline 1-172 za N-končni del in aminokisline 155-238 za C-končni del. Prekrivanje 18 aminokislin na mestu cepitve izboljša komplementacijo obeh delov fluorescenčnega proteina *in vivo*. Nukleotidno zaporedje povezovalca med DiCP in cepljenimi fluorescenčnimi proteini se je prevedlo v aminokislinsko zaporedje GGSGGGSGGS.



Slika 51: Kontrolni plazmidi za FRET eksperimente. (zgoraj) Plazmidni karti DNA konstruktov za negativno kontrolo FRET-a (*mCerulean* in *mCitrine* pod CMV promotorjem). (spodaj) Plazmidna karta pozitivne kontrole, kjer sta gena za turkizni in rumeni fluorescenčni protein povezana s povezovalcem.



Turnšek J. Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012

Slika 52: Plazmidi s cepljenimi fluorescenčnimi proteini. (zgoraj) Plazmidni karti DNA konstruktov za rekonstitucijo turkiznega fluorescenčnega proteina (mCeruelan). (spodaj) Plazmidni karti DNA konstruktov za rekonstitucijo rumenega fluorescenčnega proteina (mCitrine).

Programsko DNA z vezalnimi mesti za cinkove prste smo po prileganju oligonukleotidov in restrikciji z EcoRI in PstI vklonirali v plazmid pSB1C3. Oligonukleotida, ki smo ju uporabili za prileganje in kloniranje programske DNA uporabljene v FRET eksperimentih, sta predstavljena v prilogi A.



Slika 53: Plazmid s programsko DNA za zaznavanje FRET-a v sesalskih celicah. Vezalna mesta za DiCP, ki smo jih uporabili pri zaznavanju FRET-a v sesalskih celicah, so obkrožena. Tri vezalna mesta namenjena vezavi drugih domen so ostala nezasedena (Tyr456, Jazz in Blues).

4.1.1.2 Kontrolne restrikcije



Slika 54: Kontrolne restrikcije plazmidov uporabljenih v FRET eksperimentih. Kontrolne restrikcije smo izvedli z naslednjimi kombinacijami restrikcijskih encimov: SacI (proge A–F), NdeI in PstI (proga G) ter EcoRI in AlwNI (proga H). Nanesli smo jih na 1,0 % agarozni gel. Razlaga oznak nad slikami gelov: L – DNA lestvica (GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder); A – pSB1AK8 s CMV-*cCFP*-*HivC*-term (4006 bp in 650 bp); B – pSB1AK8 s CMV-*Gli1-nCFP*-term (4006 bp in 1163 bp); C – pSB1AK8 s CMV-*cYFP*-*Zif268*-term (4006 bp in 686 bp); D – pSB1AK8 s CMV-*PBSII-nYFP*-term (4006 bp in 890 bp); E – pSB1AK8 s CMV-*mCitrine*-term (4006 bp in 1541 bp); G – *mCerulean*-C1 (3597 bp in 1134 bp); H – pSB1C3 z DNA programom (1420 bp in 702 bp).



4.1.1.3 Shema sistema

Slika 55: Dokaz hkratne vezave DiCP na programsko DNA s FRET-om. Po vezavi fuzijskih proteinov na programsko DNA pride do rekonstitucije N-končnega in C-končnega dela fluorescenčnih proteinov mCerulean in mCitrine. Razdalja med obema proteinoma po rekonstituciji ustreza približno dvema obratoma DNA (\approx 7 nm), kar še spada v okvir 1–10 nm, kjer FRET lahko zaznamo. Valovi med fluorescenčnima proteinoma zgolj shematično kažejo na prenos energije med njima. V resnici do emisije in absorpcije fotonov ne pride.

4.1.1.4 Rezultati konfokalne mikroskopije

4.1.1.4.1 Transfekcija



Slika 56: Transfekcija celic HEK293 za zaznavanje FRET-a na programski DNA. Negativno kontrolo sta predstavljala prosta mCerulean in mCitrine, za pozitivno kontrolo smo vzeli s povezovalcem povezana mCerulean in mCitrine, povsem na desni pa je načrtovan sistem, ki vključuje programsko DNA z vezanimi fuzijskimi proteini. Plazmid s programsko DNA je bil prisoten povsod, s čimer smo izenačili količine DNA za transfekcijo.

4.1.1.4.2 Izražanje in lokalizacija proteinov

Celice, kjer smo želeli zazanati FRET na programski DNA, smo transficirali s 5 različnimi plazmidi. Pod mikroskopom smo opazili tri populacije celic, ki so se razlikovale v intenziteti signalov posameznih rekonstituiranih fluorescenčnih proteinov, kar bi lahko bila posledica razlik v učinkovitosti transfekcije na nivoju posamezne celice. Dve populaciji so predstavljale celice, kjer je bil signal rekonstituiranega donorja ali akceptorja močnejši, v tretji pa so bile celice s podobno intenziteto rekonstituiranih fluorescenčnih proteinov. Za meritve FRET-a smo izbrali slednje. Fuzijski proteini z DiCP so se nahajali v jedru (pogl. 5.1.1.2).



Slika 57: Razlike v izražanju cepljenih fluorescenčnih proteinov. S puščicami so označene reprezentativne celice posameznih populacij. (a) Rekonstituiran mCerulean v donorskem kanalu. (b) Rekonstituiran mCitrine v akceptorskem kanalu. (c) Prekrivanje donorskega in akceptorskega kanala. Opazimo, da prevladuje barva močnejšega signala. V tem primeru bi za merjenje FRET-a izbrali označeno celico rumenkaste barve, kjer sta signala obeh kanalov približno enako močna.



Slika 58: Kolokalizacija fuzijskih proteinov za zaznavanje FRET-a na programski DNA. (a) Celice v donorskem kanalu (mCerulean). (b) Celice v akceptorskem kanalu (mCitrine). (c) Prekrivanje obeh kanalov. (d) Z barvanjem celic z fluorescenčnim barvilom Hoechst 34580 smo pokazali jedrno kolokalizacijo cepljenih fluorescenčnih proteinov. Iz te slike je razvidno, da so bile v v mikroskopskih preparatih tudi celice, kjer ni bilo prisotnih cepljenih fluorescenčnih proteinov oziroma je bil prisoten le eden od para in/ali plazmid s programsko DNA.



Slika 59: Primer izvedbe zaznavanja FRET-a z metodo bledenja akceptorja. (a) Celice v donorskem kanalu (mCerulean) po bledenju akceptorja. (b) Celice v akceptorskem kanalu (mCitrine) po bledenju akceptorja. Rumena puščica označuje izbran ROI (ang. »Region Of Interest«), ki smo ga 2-krat obsevali s laserjem s 100 % jakostjo, s čimer smo uničili signal akceptorja. (c) Prekrivanje obeh kanalov razkrije mesto zazanavanja FRET-a s povečanim signalom donorja (rdeča puščica).

4.1.1.4.3 Meritve učinkovitosti FRET-a

Za vsako kombinacijo plazmidov (negativna kontrola, pozitivna kontrola in FRET na programski DNA) smo izvedli 5 neodvisnih meritev. Zanimala nas je učinkovitost FRET-a.



Slika 60: Učinkovitost FRET-a. Vezava fuzijskih proteinov na programsko DNA vodi v rekonstitucijo fluorescenčnih proteinov in posledično FRET.

Morebitni razlogi, zakaj vrednosti FRET-a na programski DNA ne dosegajo vrednosti pozitivne kontrole, so opisani v razpravi (pogl. 5.1.1.5).

4.1.1.4.4 Statistična obdelava meritev.

Postavili smo ničelno (H₀) in alternativno (H_A) domnevo.

H₀: Povprečna učinkovitost FRET-a ob prisotnosti programske DNA je enaka povprečni učinkovitosti FRET-a v primeru negativne kontrole.

H_A: Povprečna učinkovitost FRET-a ob prisotnosti programske DNA je višja od povprečne učinkovitosti FRET-a v primeru negativne kontrole.

Predpostavimo, da bi neskončno meritev v obeh primerih (negativna kontrola, FRET ob prisotnosti programske DNA) dalo normalno ali Gaussovo porazdelitev. V tem primeru lahko izvedemo *t*-test. Odločili smo se za dvovzorčni test ob predpostavki neenakih varianc z enostransko alternativno domnevo. Microsoft Excel 2010 za rezultat vrne verjetnost (P-vrednost), da se bo pojavila višja vrednost *t*-statistike, če upoštevamo da sta vhodna nabora podatkov (»matrika1« in »matrika2«) vzorca iz populacij z enakima srednjima vrednostma.

Na osnovi obeh vzorčnih populacij je program izračunal, da je P-vrednost enaka 0,00097. S tveganjem manjšim od izbrane stopnje značilnosti ($\alpha = 0,05$) trdimo, da je učinkovitost FRET-a ob prisotnosti programske DNA večja od negativne kontrole. Z drugimi besedami: samo $\approx 0,1$ % verjetno je, da je večja učinkovitost FRET-a ob prisotnosti programske DNA naključna. S tem zavrnemo ničelno domnevo H₀ in obdržimo alternativno domnevo H_A.

Iz alternativne domneve torej sledi, da je programska DNA posredovala rekonstitucijo fluorescenčnih proteinov in posledično FRET med njima.

4.2 PRIPRAVA PROTEINOV ZA FUNKCIONALIZACIJO DNA ORIGAMIJA

4.2.1 Priprava DNA konstruktov

4.2.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov

DNA konstrukta fuzijskih proteinov za BRET na DNA origamiju sta bila pripravljena z osnovnimi metodami molekulskega kloniranja in vklonirana v plazmid pET41a(+) med restrikcijski mesti NdeI in XhoI.



Slika 61: DNA konstrukta fuzijskih proteinov za BRET na DNA origamiju.

4.2.1.2 Kontrolne restrikcije



Slika 62: Kontrolni restrikciji DNA konstruktov fuzijskih proteinov za BRET na DNA origamiju. Kontrolni restrikciji smo izvedli s kombinacijo restrikcijskih encimov NdeI in XhoI in ju nanesli na 1,0 % agarozni gel. Povsem na levi je DNA lestvica (L, GeneRulerTM DNA Ladder Mix). Fragment, ki ustreza ogrodju plazmida pET41a(+), je dolg 5013 bp (progi A in B). Fragment z zapisom za MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis meri 2413 bp (proga A), fragment, ki kodira MBP-RLuc-2C7-8xHis pa 2665 bp (proga B).

4.2.1.3 Shema sistema

S fuzijskimi proteini predstavljenimi v diplomskem delu želimo pokazati princip vezave DiCP na DNA origami z nanometrsko natančnostjo. V DNA origami lahko vezalne oligonukleotide vključimo z najmanjšo prostorsko ločljivostjo ≈ 6 nm (Rothemund, 2006), kar je primerna razdalja za zaznavanje prenosa energije z resonanco bioluminiscence.



Slika 63: Funkcionalizacija DNA origamija z BRET partnerjema. (a) Molekulska modela obeh fuzijskih proteinov za zaznavanje BRET-a na DNA origamiju sta bila pripravljena z računalniškim programom VMD (Humphrey in sod., 1996). BRET zaznamo potem, ko RLuc katalizira oksidativno dekarboksilacijo svojega substrata koelenterazina v koelenteramid, ob čemer se sprosti svetloba z valovno dolžino 475 nm, ki vzbudi mCitrine, če je le-ta dovolj blizu (1–10 nm). (b) Funkcionalizacija DNA origamija s proteini za BRET vezanimi na točno določena mesta. Razdalja med sosednjima proteinoma lahko znaša najmanj 6 nm.

4.2.2 Produkcija in izolacija proteinov

Fuzijska proteina za funkcionalizacijo DNA origamija smo najprej producirali v naslednjih dveh oblikah: mCitrine-AZPA4-8xHis ($M_W = 48,4$ kDa) in RLuc-2C7-8xHis ($M_W = 59,5$ kDa). Oba proteina sta bila po produkciji netopna.



Slika 64: Prisotnost fuzijskih proteinov brez domene za izboljšano topnost v netopni obliki. Z Western prenosom smo sicer pokazali izražanje obeh fuzijskih proteinov, a le v peletu lizata. Oznake na sliki: A – netopna frakcija lizata po produkciji mCitrine-AZPA4-8xHis ($M_W = 48,4$ kDa), B – netopna frakcija lizata po produkciji RLuc-2C7-8xHis ($M_W = 59,5$ kDa). Pogoji produkcije: 2x YT gojišče (brez dodane glukoze), 0,1 mM ZnCl₂, 100 mg/l kanamcina, pri 180 obr/min in 37 °C. Indukcija z 2 mM IPTG je trajala 7 h.

Ker bi to zahtevalo izolacijo proteinov pod denaturirajočimi pogoji, čemur smo se zaradi občutljivosti 3D strukture cinkovih prstov želeli izogniti, smo se odločili, da skušamo najprej optimizirati pogoje produkcije. Kljub poskusom, s katerimi smo z znižanjem temperature produkcije na 24 °C in koncentracije IPTG na 0,5 mM želeli izboljšati topnost obeh proteinov, nam to ni uspelo. Dosegli smo le manjše izboljšanje topnosti mCitrine-AZPA4-8xHis (rezultati niso prikazani). S slabo topnostjo fuzijskih proteinov, ki so vključevali DiCP, smo se sicer srečali že med projektom iGEM 2010 (iGEM ... , 2010b).

Sklenili smo, da poiščemo proteinsko domeno, ki poveča topnost spremljevalnega proteina v fuziji. Izkaže se, da je takšnih domen precej, s čimer ob različnih načinih variacije pogojev produkcije (npr. optimizacija kodonov v ORF-u, uporaba plazmidov v majhnem številu kopij, uporaba šibkejših promotorjev, nižja temperatura, nižja koncentracija induktorja, optimizacija sestave gojišč itd.), predstavljajo dodatno strategijo za izboljšano topnost proteinov oziroma preprečevanje nastajanja inkluzijskih telesc. V literaturi največkrat omenjane takšne proteinske domene (z navedbo polnega imena in velikosti) so: GST (glutation S-transferaza, ≈ 26 kDa), TRX (tioredoksin, ≈ 12 kDa), NusA (ang. »Nutilizing substance A«, ≈ 55 kDa) in MBP (maltoza vezalni protein, ≈ 40 kDa). Za GST, TRX in MBP je znano, da poleg povečane topnosti, omogočajo tudi učinkovitejše zvitje spremljevalnega proteina. O naštetih dejstvih o strategijah izboljšanja topnosti proteinov po produkciji obširno razpravljajo Fox in sod. (2003), Fox in Waugh (2002), Gustafsson in sod. (2012), Kapust in Waugh (1999), Makrides (1996), Nallamsetty in Waugh (2006), Sørensen in Mortensen (2005a, 2005b), Stevens (2000) in Terpe (2006).

Odločili smo se, da fuzijskima proteinoma na N-konec dodamo MBP. Plazmid s tem genom smo naročili pri podjetju Addgene in izhaja iz dela Nallamsetty in sod. (2005).

Čeprav poročajo o znižani topnosti fuzijskih proteinov z MBP, ki imajo histidinsko oznako na C-koncu (Routzahn in Waugh, 2002), smo kljub temu opazili znatno izboljšanje topnosti obeh fuzijskih proteinov, ki smo ju tako lahko izolirali pod nativnimi pogoji z Ni-NTA kelatno kromatografijo (sl. 65).



Slika 65: Produkcija in izolacija fuzijskih proteinov za funkcionalizacija DNA origamija z BRET-om. MBP na N-koncu obeh fuzij je izboljšal topnost obeh proteinov tako pri produkciji pri 30 °C kot 37 °C. (a) SDS-PAGE gel barvan s Commassie modrim. A: supernatant MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (produkcija pri 30 °C), B: supernatant MBP-RLuc-2C7-8xHis (produkcija pri 30 °C), C: supernatant MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (produkcija pri 37 °C). D: supernatant MBP-RLuc-2C7-8xHis (produkcija pri 37 °C). Odebeljene črne lise predstavljajo čezmerno izražena proteina. (b) Western prenos: od E do H si vzorci sledijo v enakem vrstnem redu kot na sliki (a). (c) SDS-PAGE gel barvan s Commassie modrim: I – izoliran protein MBP-RLuc-2C7-8xHis (100 mM imidazolna frakcija), J – izoliran protein MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (100 mM imidazolna frakcija).

Koncentraciji proteinov po dializi smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 280 nm in izračunali kot je opisano v poglavju 3.2.6.3.4.

Protein	γ [mg/ml]	c [µM]
MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis	0,33	3,6
MBP-RLuc-2C7-8xHis*	0,22	1,6

Preglednica 31: Koncentraciji fuzijskih proteinov po dializi.

*Spekter tega proteina je bil pomaknjen proti 260 nm.

4.2.3 Karakterizacija fuzijskih proteinov

Preverili smo aktivnost obeh fuzijskih proteinov. Kljub dejstvu, da sta bila z dodanim MBP topna, to kljub vsemu še ni bilo zagotovilo, da sta tudi pravilno zvita in s tem funkcionalna. S serijo eksperimentov smo pokazali, da sta oba proteina ohranila svojo funkcionalnost, tj. fluorescenca in vezava na DNA v primeru MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in bioluminiscenca v primeru MBP-RLuc-2C7-8xHis.

4.2.3.1 Fuzijski protein MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis



4.2.3.1.1 Cirkularni dikroizem in ocena deležev α -vijačnic in β -struktur

Slika 66: Povprečna molarna eliptičnost podana na AK ostanek v fuzijskem proteinu MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis. Oblika krivulje sicer ustreza strukturi proteina iz pretežno α -vijačnic, vendar teoretična analiza fuzijskega proteina in obdelava CD vrednosti med 200 in 240 nm s programom K2d kaže na drugačna razmerja med α -vijačnicami, β -strukturami in naključnimi strukturami v proteinu.

Preglednica 32: Teoretične in eksperimentalne vrednosti deležev sekundarnih struktur v fuzijskem proteinu MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis.

	teoretična napoved	analiza s K2d
število AK	786*	813
delež α-vijačnic	33,1 %	18,0 %
delež β-struktur	21,6 %	34,0 %
delež naključnih struktur	39,8 %	49,0 %

*Teoretična napoved ni upoštevala oktahistidinske oznake v fuziji in povezovalcev med posameznimi proteini.

K2d ima v svoj algoritem vgrajeno tudi merilo, ki pove, ali so napovedani deleži sekundarnih struktur zanesljivi. To stori tako, da nabor vhodnih podatkov (torej eksperimentalne vrednosti) primerja s tistimi, s katerimi so učili nevronsko mrežo. Večje kot je razhajanje med interpoliranim spektrom iz baze spektrov v programu in našim, manjša je verjetnost za pravilno napoved. Po analizi vrednosti iz priloge E je program zaključil, da dobljeni deleži niso zanesljivi.

4.2.3.1.2 Ocena hidrodinamskega radija proteina z DLS

Analizirali smo dializat proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis v koncentraciji 0,28 mg/ml. Temperatura merilne celice je znašala 20 °C, predpostavljena viskoznost merjene raztopine je bila nastavljena na 1,0135 cP, predpostavljena refrakcijska indeksa pa 1,33 (za pufer) in 1,45 (za material merilne kivete).



Slika 67: Ocena hidrodinamskega radija fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis. (a) Primer rezultata meritev dinamičnega sipanja svetlobe. 99,9 % delcev v tem vzorcu je ustrezalo velikosti 30,8 nm, preostala manjšina pa 97,6 nm. (b) Povprečje treh neodvisnih meritev je znašalo \approx 31,4 nm.



4.2.3.1.3 Fluorescenčni spekter

Slika 68: Emisijski spekter supernatanta fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis. Rdeča črta predstavlja slepi vzorec (lizni pufer), zelena negativno kontrolo (supernatant celic brez plazmida z zapisom za protein), modra pa emisijski spekter MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis s pričakovanim emisijskim vrhom pri ≈ 530 nm po vzbujanju s svetlobo z valovno dolžino 485 nm.



4.2.3.1.4 Test zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA)

Slika 69: EMSA z MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in vsemi tipi vezalnih oligonukleotidov za vezavo proteina na DNA origami. (a)–(c) MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis se je vezal na vse tri tipe vezalnih oligonukleotidov. Zamik elektroforezne mobilnosti kompleksa smo zaznali pri \approx 750 bp glede na DNA lestvico GeneRulerTM 50 bp DNA Ladder. Pri 8- in 10-kratnem presežku proteina smo opazili (sl. c) superzamik tik pod jamico, kar je morda posledica agregacije proteina pri višjih koncentracijah, ki v agregat zamreži tudi vezalne oligonukleotide, ali pa prisotnosti ostankov genomske DNA. (d) Negativno kontrolo je predstavljalo vezalno mesto za ortogonalno vezavno domeno 6F6 (prav tako iz 6 cinkovih prstov). (e) Samo protein v enakih presežkih kot v primerih (a)–(c).

4.2.3.1.5 Kvalitativni test z UV lučjo



Slika 70: Ocena funkcionalnosti proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis. (a) Od leve proti desni si sledijo: negativna kontrola fluorescence (izoliran protein brez fluorescenčnih lastnosti), 50, 100 in 250 mM imidazolne frakcije izoliranega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis. (b) V vzorec v obliki besede »YFP« odpipetirana 100 mM imidazolna frakcija izoliranega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis slikana pod UV lučjo.

4.2.3.2 Fuzijski protein MBP-RLuc-2C7-8xHis

4.2.3.2.1 Luciferazni test

Preglednica 33: Vrednosti meritev bioluminscence supernatanta proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis.

Vzorec	Povprečje _(N=3)	SD
neredčen	1,8 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁵
2-krat redčen	6,8 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁵
5-krat redčen	$2,5 \ge 10^5$	4,1 x 10 ⁴



Slika 71: Encimska aktivnost fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis. Aktivnost fuzijskega proteina smo preverili z luciferaznim testom. Iz supernatanta smo nato protein izolirali pod nativnimi pogoji.

4.2.3.2.2 Kvalitativni test z G:BOX



Slika 72: Ocena funkcionalnosti fuzijskega proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis. (a) V nekoliko temneje obarvanih jamicah je po 100 μ l supernatanta proteina MBP-RLuc-2C7-8xHis. (b) Po dodatku 100 μ l substrata koelenterazina h smo bioluminiscenčni signal supernatanta zaznali z napravo Syngene G:BOX. Tja, kjer je signal močnejši (en primer označen s puščico), smo substrat dodali nekoliko kasneje kot v ostale, svetlejše jamice.

4.3 PRODUKCIJA KAROTENOIDOV OB PRISOTNOSTI PROGRAMSKE DNA

4.3.1 Priprava DNA konstruktov

4.3.1.1 Opis kloniranja in plazmidne karte končnih DNA konstruktov

4.3.1.1.1 Programska DNA

Po prileganju oligonukleotidov in tritočkovni ligaciji v plazmidni vektor pSB1K3 rezan z restrikcijskima encimoma XbaI in PstI smo dobili prvi dve ponovitvi programske DNA. S kloniranjem po sistemu BioKock smo v naslednjih treh krogih kloniranja dobili končne DNA konstrukte s 16 ponovitvami programske DNA (le-ta je bila z vsakim krogom kloniranja 2-krat daljša). Oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za prileganje in kloniranje programske DNA uporabljene v eksperimentih z biosintezo karotenoidov, so predstavljeni v prilogi A.



Slika 73: Plazmidi s programsko DNA. 16 ponovitev programske DNA z različno dolgimi vmesniki (pod (a): 2 bp, pod (b) 4 bp in pod (c) 8 bp) med vezalnimi mesti za cinkove prste smo vklonirali v plazmidni vektor pSB1K3. Arhitekturo programskih DNA lahko predstavimo tudi kot [1:1:1:1]₁₆, kar pomeni 16 ponovitev programske DNA znotraj katere je po eno vezalno mesto za vsako DiCP.
Turnšek J. Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2012



Slika 74: Kontrolni plazmid brez programske DNA. Plazmidni vektor pSB1K3 smo rezali z restrikcijskima encimoma XbaI in SpeI (s tem smo dobili ujemajoče se lepljive konce) in ga z ligacijo ponovno zaprli samega vase. Ker plazmid ni vseboval vezalnih mest za DNA vezavne domene, ki smo jih uporabili v diplomskem delu, je služil kot negativna kontrola pri eksperimentih z biosintezo karotenoidov.

4.3.1.1.2 Operoni za biosintezo karotenoidov

Operoni za biosintezo karotenoidov so bili pripravljeni z osnovnimi metodami molekulskega kloniranja (po sistemu BioKock) v plazmidnem vektorju pSB1AK3, nato pa preklonirani v plazmidni vektor v majhnem številu kopij pSB4C5. Vsakega izmed genov, ki kodira fuzijo encima z DiCP, vključno z RBS mesti, start in stop kodonom, smo pripravili ločeno ter jih nato sestavili v funkcionalen operon. Nukleotidno zaporedje povezovalca med DiCP in encimi se je prevedlo v aminokislinsko zaporedje GGSGGGSGGS. Na 5' konec operona smo vklonirali z monosharidom arabinozo inducibilen pBAD promotor. Pri pripravi teh DNA konstruktov so med iGEM projektom sodelovali tudi ostali člani ekipe, v največji meri pa Tina Ilc.



Slika 75: Operoni za biosintezo karotenoidov likopena, β -karotena in zeaksantina. Nad puščicama sta imeni genov za encima, ki katalizirata nastanek β -karotena (CrtY, likopen β -ciklaza) oziroma zeaksantina (CrtZ, β -karoten hidroksilaza).

4.3.1.1.2.1 Mehanizem delovanja pBAD promotorja



Slika 76: Shema mehanizma delovanja pBAD promotorja (Sørensen in Mortensen, 2005a: 116). Delovanje pBAD promotorja je odvisno od AraC proteina, ki deluje kot represor ali aktivator. V odsotnosti arabinoze se AraC v obliki dimera veže na operatorski mesti O1 in O2 (leži 210 bp navzgor od pBAD promotorja znotraj *araC* gena). Nastala DNA zanka prepreči izražanje tarčnega gena. Ob prisotnosti arabinoze AraC dimer spremeni konformacijo, pri čemer se ena polovica dimera veže na I mesto, s čimer sproži prepisovanje tarčnega gena. Podoben mehanizem nadzira izražanje AraE transporterja, kar vodi v pozitivno povratno zanko in s tem povezane težave pBAD promotorja. Več o njih v poglavju 4.3.3.2 in prilogi J.

4.3.1.2 Kontrolne restrikcije

4.3.1.2.1 Programska DNA



Slika 77: Kontrolne restrikcije plazmidov s programsko DNA. Kontrolne restrikcije smo izvedli s kombinacijo restrikcijskih encimov XbaI in PstI (proge A, B in C) ali HindIII in AatII (proga D) ter jih nanesli na 1,0 % agarozni gel. Razlaga oznak nad slikami gelov: L – DNA lestvica (GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder); A – 16 ponovitev programske DNA z 2 bp vmesnikom (2178 bp in 1065 bp); B – 16 ponovitev programske DNA s 4 bp vmesnikom (2178 bp in 1186 bp); C: 16 ponovitev programske DNA z 8 bp vmesnikom (2178 bp in 1442 bp); D: kontrolni plazmid brez programske DNA (1425 bp in 721 bp).

4.3.1.2.2 Operoni za biosintezo karotenoidov



Slika 78: Kontrolne restrikcije plazmidov z operoni za biosintezo karotenoidov. Kontrolne restrikcije smo izvedli s kombinacijo restrikcijskih encimov XbaI in PstI. Razlaga oznak nad slikami gelov: L – DNA lestvica (GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder); A – operon za biosintezo likopena (3195 bp in 5602 bp); B – operon za biosintezo β -karotena (3195 bp in 7068 bp); C – operon za biosintezo zeaksantina (3195 bp in 8186 bp).

4.3.2 Ocena aktivnosti operonov za biosintezo karotenoidov

4.3.2.1 Obarvanost produkcijskih kultur, peletiranih celic in ekstraktov

Ker za karotenoide, ki smo jih producirali, velja, da imajo absorpcijske maksimume v vidnem delu svetlobnega spektra, smo funkcionalnost operonov lahko ocenili že na podlagi obarvanosti bakterijskih kultur. Za še večjo transparentnost razlik med posameznimi metaboliti, smo celice centrifugirali in jih resuspendirali v brezbarvnem minimalnem M9 gojišču (LB zaradi svoje rumenkaste barve moti oceno obarvanosti).



Slika 79: Obarvanost produkcijskih kultur, peletiranih celic in ekstraktov. (a) Erlenmajerice s 100 mL produkcijskih kultur karotenoidov v LB tekočem gojišču. (b) Peletirane celice. (c) Peletirane celice resuspendirane v brezbarvnem minimalnem M9 gojišču za lažjo primerjavo obarvanosti kultur. (d) Ekstrakti karotenoidov v etilacetatu. Na vseh slikah si sledijo od leve proti desni: likopen, β -karoten in zeaksantin.



4.3.2.2 Spektrofotometrična analiza ekstraktov

Slika 80: Absorpcijski spektri likopena, β -karotena in zeaksantina. Absorpcijske spektre etilacetatnih ekstraktov smo izmerili z diodnim spektrofotometrom HP 8452A. Za likopen je značilen trojni vrh z absorpcijskimi maksimumi pri cca. 450, 470 in 500 nm. β -karoten in zeaksantin imata absorpcijske maksimume pri cca. 425, 450 in 480 nm. Točen položaj vrhov je odvisen od organskega topila, v katerem se karotenoidi nahajajo (Rodriguez-Amaya in Kimura, 2004: 14).

4.3.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA

4.3.3.1 Biosinteza likopena

Prvi obarvan produkt karotenoidne biosintezne poti je likopen. Operon z geni za fuzijske encime Jazz-CrtE, Blues-CrtB in CrtI-Zif268 smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5 α s plazmidom s 16 ponovitvami programske DNA z 2 bp vmesnikom.



Slika 81: Shema biosinteze likopena ob prisotnosti programske DNA. Končni produkt endogenega dela karotenoidne biosintezne poti v *E. coli*, farnezil pirofosfat (FPP), je substrat prvemu heterolognemu encimu GGPP sintazi (CrtE), ki katalizira nastanek C20 molekule geranilgeranil pirofosfata (GGPP). Slednji se z dvema reakcijama, ki ju katalizirata encima fitoen sintaza (CrtB) in fitoen desaturaza (CrtI), oba preko svoje lastne DNA vezavne domene vezana na programsko DNA, pretvori v rdeče obarvan končni produkt, likopen. Bližina vezave sosednjih dveh encimov vodi v izboljšano produkcijo spojine. Temno sivo so vmesniki med vezalnimi mesti za fuzijske proteine.



Slika 82: Produkcija likopena ob prisotnosti programske DNA. Graf prikazuje produkcijske titre likopena po 8 urah rasti celic ob prisotnosti 0,01 % (w/v) arabinoze. Po produkciji likopena ob prisotnosti programske DNA je nastalo \approx 4-krat več likopena kot po produkciji s kontrolnim plazmidom

4.3.3.2 Biosinteza β-karotena

pBAD promotor deluje po principu vse ali nič. To pomeni, da je izražanje genov v vsaki posamezni celici maksimalno ali pa ga sploh ni, število maksimalno induciranih celic pa je odvisno od koncentracije arabinoze v gojišču. Omenjena lastnost promotorja vodi v heterogeno populacijo celic, od katerih nekatere izražajo tarčni gen, druge pa ne. Opisana dejstva so podrobno predstavili Guzman in sod. (1995) ter Siegele in Hu (1997). Zaradi takšnega obnašanja promotorja smo se odločili, da produkcijo β-karotena preizkusimo v sevu *E. coli* BW27783. V tem sevu so Khlebnikov in sod. (2001) kromosomalni *araE* gen (kodira arabinozni transporter) pod arabinoznim promotorjem zamenejali z *araE* pod konstitutivnim promotorjem in s tem prekinili pozitivno povratno zanko, ki vodi v takšno obnašanje promotorja (pril. J). Z uporabo tega seva smo dosegli uniformno izražanje encimov biosintezne poti v vsaki celici.



Slika 83: Shema biosinteze β -karotena ob prisotnosti programske DNA. Biosinteza β -karotena ob prisotnosti programske DNA do likopena poteče kot je opisano pod sliko 81. Likopen se nato z dodatno reakcijo, ki jo katalizira encim likopen β -ciklaza (CrtY), pretvori v oranžno obarvan ciklični karoten β -karoten. Dolžina vmesnika (2 bp, 4 bp ali 8 bp) med vezalnimi mesti programske DNA vpliva na produkcijske titre končnega produkta.

Po analizi ekstraktov smo ugotovili, da se je ves likopen pretvoril v β -karoten (razvidno iz HPLC analize, sl. 87), prav tako pa smo opazili od programske DNA odvisne končne koncentracije β -karotena. Po produkciji β -karotena ob prisotnosti programske DNA z 2 bp in 4 bp vmesnikom je nastalo \approx 3,5- oziroma \approx 2,5-krat več spojine kot po produkciji s kontrolnim plazmidom.



Slika 84: Produkcija β -karotena ob prisotnosti programske DNA. Graf prikazuje produkcijske titre β -karotena po 8 urah rasti celic ob prisotnosti 0,01 % (w/v) arabinoze.

4.3.3.3 Biosinteza zeaksantina

Delovanje operona za biosintezo zeaksantina smo preiskusili v celicah *E. coli* DH5 α , nismo pa še izvedli eksperimenta, s katerim bi preverili, kakšen je vpliv programske DNA na produkcijo te spojine. Identiteto zeaksantina smo sicer dokazali s HPLC. Razlog, zakaj nismo encima β -karoten hidroksilaze (CrtZ) povezali s HivC, kar bi ga še bolj približalo preostalim encimom biosintezne poti (sl. 85), je sledeč: *HivC* smo povezali s sintetičnim genom *crtO*, ki kodira encim β -karoten ketolazo/oksigenazo (gen načrtovan po Scaife in sod., 2008), s čimer smo želeli producirati kantaksantin. Slednji je prav tako lahko substrat za CrtZ (sl. 35 in 36), kar bi vodilo v nastanek astaksantina. Žal pa se je izkazalo, da dodatek CrtO v bakterijskih celicah ni vodil do nastanka zeaksantina. Tako imamo sedaj dve možnosti: ali načrtovati novo programsko DNA z vezalnim mestom za Gli1, ki bo sledilo vezalnemu mestu za PBSII, ali pa *crtZ* povezati s *HivC* in obdržati že obstoječo programsko DNA.



Slika 85: Shema načrtovane biosinteze zeaksantina ob prisotnosti programske DNA. Po štirih zaporednih reakcijah, ki jih katalizirajo encimi CrtE, CrtB, CrtI in CrtY, se β -karoten z novo heterologno biosintezno stopnjo pretvori v rumeno obarvan ksantofil zeaksantin. Hidroksilacijo obeh β -iononskih obročev v molekuli β -karotena katalizira encim β -karoten hidroksilaza (CrtZ). Z zeleno je označeno nezapolnjeno vezalno mesto za triprstno DiCP HivC.

V prihodnje želimo torej preveriti, kakšna bo produkcija zeaksantina ob prisotnosti programske DNA, prav tako pa biosintezno pot podaljšati do astaksantina, in sicer s crtW genom (kodira β -karoten ketolazo tako kot crtO), ki smo ga prejeli od japonske iGEM ekipe Tokyo Tech 2010 (gen nam je poslal prof. Daisuke Kiga), izhaja pa iz dela Hasanuma in sod. (2008).

4.3.4 Kemijska analiza karotenoidov s HPLC



4.3.4.1 Likopen

Slika 86: HPLC kromatogram ekstrakta likopena. Ekstrakt celic *E. coli* DH5 α z operonom za likopen je vseboval likopen v čistoti primerljivi s standardno raztopino. V slednji je bil poleg likopena prisoten tudi β -karoten.

4.3.4.2 β-karoten



Slika 87: HPLC kromatogram ekstrakta β -karotena. Ekstrakt celic *E. coli* BW27783 z operonom za β -karoten je vseboval β -karoten v čistoti primerljivi s standardno raztopino. V ekstraktih nismo opazili likopena, kar pomeni, da reakcija ciklizacije likopena poteče pod mejo pretvorbenega števila (k_{cat}) encima CrtY (likopen β -ciklaza).



4.3.4.3 Zeaksantin

Slika 88: HPLC kromatogram ekstrakta zeaksantina. Skupaj s spektrofotometrično analizo ekstrakta in oceno obarvanosti produkcijskih kultur, peletiranih celic in ekstraktov, predstavlja ta kromatogram dokaz o aktivnosti encima β -karoten hidroksilaze (CrtZ) v obliki fuzije s petprstno domeno Gli1. Standardna raztopina zeaksantina je potovala z drugačno mobilno fazo (drugačen retencijski čas), zato je nismo vključili v ta kromatogram.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Zaznavanje FRET-a na programski DNA

5.1.1.1 Razlike v izražanju proteinov

Iz slike 57 je razvidno, da se signali rekonstituiranih fluorescenčnih proteinov med celicami razlikujejo. Slika 58 pa nam pove, da v nekaterih celicah do rekonstitucije sploh ne pride (v nekaterih jedrih je prisoten le signal barvila Hoechst 34580). Razloga za to sta dva:

(1) Razlike v količini plazmidov v celicah (npr. ena celica je bila transficirana z večjo količino plazmidov za rekonstitucijo mCerulean kot s tistimi za rekonstitucijo mCitrine). Plazmidi, v katerih so bili geni za te fuzijske proteine, se v sesalskih celicah HEK293 ne morejo podvajati – plazmidi bi morali imeti SV40 mesto začetka podvajanja, transficirati pa bi jih morali v HEK293T celice – kar ima za posledico različno količino izraženih proteinov.

(2) Hkratna transfekcija celic s petimi plazmidi pomeni veliko možnih kombinacij plazmidov, ki se lahko znajdejo v transfekcijskem kompleksu in posledično v celici. V populaciji celic lahko najdemo tudi takšne, ki ne vsebuje ustrezne kombinacije za rekonstitucijo fluorescenčnega proteina.

5.1.1.2 Znotrajcelična lokalizacija proteinov in programske DNA

Iz slike 58 je razvidno, da se cepljeni fluorescenčni proteini z DiCP nahajajo v jedru (signali mCerulean, mCitrine in barvila Hoechst 34580 treh celic sovpadajo). Iz preglednice 34 razberemo, da so fuzijski proteini z DiCP bazični (razlog: bazičnost DiCP), znotraj HEK293 celic, kjer je pH okoli 7,3, pa posledično pozitivno nabiti. To pomeni, da se v tem pogledu lahko obnašajo podobno kot jedrna signalna zaporedja (NLS), ki so prav tako izrazito bazična [npr. pI NLS velikega T-antigena virusa SV40 znaša 11,33 (zaporedje PKKKRKV)], kar bi lahko bil razlog za njihovo nahajanje v jedru.

Protein	≈ pI	neto naboj pri pH ≈ 7,3
cCFP-HivC	9,9	+
Gli1-nCFP	8,9	+
cYFP-Zif268	9,3	+
PBSII-nYFP	9,0	+

Preglednica 34: Izoelektrične točke proteinov za FRET na programski DNA.

Naslednje pomembno vprašanje je, ali se je tudi plazmid s programsko DNA translociral v jedro, kjer so bili proteini za vezavo nanj. Že iz dejstva, da se episomalno kodirani geni v sesalskih celicah izrazijo, lahko sklepamo, da plazmidi nekako morajo priti v jedro, kjer je transkripcijski aparat za prepis genov, ki jih nosijo. Navedeno potrjuje tudi literatura: Lukacs in sod. (2000) so ugotovili, da dsDNA molekule večje od 2000 bp skozi citoplazmo sesalskih celic ne morejo potovati na osnovi proste difuzije. V dveh člankih nekaj let kasneje (Tzfira, 2006; Vaughan in Dean, 2005) predlagajo transport plazmidne DNA do jedra s pomočjo mikrotubulov in molekularnih motorjev kot je npr. dinein. O možnih mehanizmih prenosa plazmidne DNA v jedro sesalskih celic po transfekciji s kationskimi reagenti obširno razpravljata Elouahabi in Ruysschaert (2005). Prisotnost plazmida s programsko DNA v jedru (ob sočasni prisotnosti rekonstituiranih mCerulean in mCitrine) bi lahko potrdili z označevanjem plazmida z barvilom z emisijskim maksimumom pomaknjenim proti rdečemu delu spektra.

5.1.1.3 Problemi uporabljenih DiCP

Kljub kolokalizaciji proteinov za FRET in programske DNA v jedru, ostaneta dve težavi, ki kažeta, da bi lahko do rekonstitucije fluorescenčnih proteinov prišlo tudi brez posredovanja programske DNA.

<u>Vezava na genomsko DNA.</u> Specifično zaporedje 18 bp se v genomu, ki je 20-krat večje od humanega, pojavi le enkrat, 9 bp zaporedje pa že v humanem kar 13000-krat (Segal in sod., 2003). V eksperimentih smo uporabili DiCP s tremi (HivC, Zif268 in PBSII) oziroma petimi (Gli1) prsti. Zelo verjetno je torej prišlo tudi do naključne vezave teh domen na genomsko DNA. Za uspešno rekonstitucijo je nujno, da sta dve takšni mesti blizu skupaj, kar pa je ob kompleksni arhitekturi kromatina tudi možno. To težavo bi lahko rešili z uporabo DiCP z vsaj 6 prsti, kar dodatno podpira tudi literatura. Tako velike domene (poleg DiCP po novem tudi TAL efektorji) se namreč uporabljajo v obliki fuzij z nukleazami za tarčno spreminjanje genoma (Wood in sod., 2011).

<u>Protein-protein interakcije.</u> Morda cepljena fragmenta fluorescenčnih proteinov spontano asociirata *in vivo*. Teh problemov sicer *in vitro* ni opaziti (glej dodatek k članku Conrado in sod., 2012, ali pa članek Stains in sod., 2005). Znano je sicer, da lahko Cys2-His2 cinkovi prsti interagirajo med seboj ali z drugimi proteini (Brayer in Segal, 2008; Mackay in Crossley, 1998). Torej bi tudi to lahko bil razlog za spontano rekonstitucijo fluorescenčnih proteinov.

5.1.1.4 Dolžina programske DNA

V FRET eksperimentih smo uporabili programsko DNA, kjer je bilo prisotno le eno vezalno mesto za vsako DiCP (sl. 53). Poleg že omenjene uporabe DiCP, ki prepoznavajo daljše zaporedje, bi bilo smiselno povečati tudi število vezalnih mest zanje na programski DNA, s čimer bi povečali verjetnost tarčne vezave.

5.1.1.5 Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a

Rezultati kažejo, da je v primeru cepljenih fluorescenčnih proteinov prišlo do FRET-a na programski DNA (sl. 59 in 60, pril. B). V primeru negativne kontrole smo pri večjih količinah plazmidov ob transfekciji dobili višje vrednosti učinkovitosti FRET-a (rezultati niso prikazani). Lahko se namreč povsem po naključju zgodi, da celice fiksiramo v trenutku, ko sta prosta mCerulean in mCitrine dovolj blizu za FRET. Ko imamo v celici izraženih več proteinov, je verjetnost za takšne dogodke večja in učinkovitost FRET-a lahko zraste. Tudi pozitivna kontrola ni idealna, saj sta tu oba FRET partnerja precej bližje (ločuje ju le 10 AK dolg povezovalec, kar pomeni < 1 nm) kot pa po rekonstituciji na programski DNA (\approx 7 nm, sl. 55). Ker učinkovitost FRET-a pada s šesto potenco razdalje med proteinoma, je razlika s pozitivno kontrolo pričakovana. Primernejša kontrola bi verjetno bila, če bi cela fluorescenčna proteina pripravili v obliki fuzij z DiCP. Zaradi naštetih težav smo količino plazmidov za transfekcijo morali optimizirati.



Slika 89: Odvisnost učinkovitosti FRET-a od razdalje med fluoroforoma (Piston in Kremers, 2007: 408). Učinkovitost FRET-a pozitivne kontrole je v območju levo od prevoja (prevoj ustreza učinkovitosti FRET-a pri R₀), učinkovitost FRET-a na programski DNA pa v območju desno od njega.

5.1.2 Priprava proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija

5.1.2.1 Uporaba MBP za izboljšano topnost DiCP

V diplomskem delu smo uspešno uporabili sicer precej uveljavljeno strategijo izboljšanja topnosti proteinov z njihovo fuzijo z maltoza vezalnim proteinom (MBP). Proteina brez MBP sta bila prisotna izključno v netopni frakciji lizata (sl. 64), po fuziji z MBP pa smo ju lahko izolirali iz supernatanta (sl. 65). Glede na to, da so vsi ostali proteini vključeni v fuzijska proteina (mCitrine, RLuc in obe DiCP: AZPA4, 2C7) ključni za njuno funkcijo (vezava na DNA origami in BRET), smo se s tem izognili morebitnim problemom pri postopku ponovnega zvijanja, kar bi morali storiti po izolaciji proteinov v denaturirajočih pogojih.

5.1.2.2 Karakterizacija fuzijskih proteinov

Izkazalo se je, da sta RLuc in mCitrine obdana z MBP in DiCP funkcionalna (tako MBP kot DiCP bi lahko vplivala na njuno funkcionalnost preko vpliva na zvitje v pravilno 3D strukturo). Luciferaza (RLuc) je katalizirala oksidativno dekarboksilacijo svojega substrata koelenterazina v vzbujen produkt koelenteramid in posledično bioluminiscenco (sl. 71 in 72), mCitrine pa je fluoresciral (sl. 68 in 70).

MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis smo še natančneje okarakterizirali s CD in DLS. S pomočjo cirkularnega dikroizma smo skušali oceniti deleže sekundarnih struktur v njem. Zgolj iz CD spektra bi lahko sklepali, da je protein zgrajen pretežno iz α -vijačnic (primerjaj sliki 48 in 66), teoretični model pa pravi, da so razmerja drugačna (pregl. 32 in pril. G), kar potrjuje tudi analiza s spletnim programom K2d (pregl. 32). Tem podatkom pa zaradi načina delovanja programa K2d ne moremo zaupati (komentar pod pregl. 32). S pomočjo DLS smo pokazali, da je hidrodinamski radij proteina okrog 30 nm (sl. 67), kar pa je več od pričakovane velikosti (ta znaša okrog 10 nm). Očitno protein v teh pogojih (dializni pufer, pregl. 12) do neke mere oligomerizira.

Pokazali smo tudi aktivnost DiCP AZPA4. MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis se je vezal na vse tri tipe vezalnih oligonukleotidov (sl. 49 in 50 ter pregl. 30), ki smo jih predvideli za vključitev v DNA origami ploščico (sl. 63). Vezavo smo opazili kot zamik v potovanju DNA tarč na agarozem gelu (sl. 69). Glede na koncentracije proteina, ki smo jih morali uporabiti, da je do zamika prišlo (v µM območju), sklepamo, da pogoji vezave niso optimalni (poročana konstanta vezave te DiCP bi naj bila v pM območju – pregl. 2). Pri višjih koncentracijah proteina (8x in 10x molarni presežek) smo zaznali superzamik tik pod jamico za nanos vzorca. Morebitni razlog za to je oligomerizacija proteina pri višjih koncentracijah, ki lahko vodi v zamreženje z vezalnimi oligonukleotidi. Večji kompleks potuje še počasneje. Ne moremo pa povsem izključiti možnosti, da je ta superzamik v resnici posledica ostanka celične DNA eluirane skupaj s proteinom. Iz rezultatov na sliki 69 tudi sklepamo, da se AZPA4 veže specifično, saj po inkubaciji z vezalnim oligonukleotidom za ortogonalno DiCP 6F6 zamika elektroforezne mobilnosti nismo zaznali.

Na podlagi obeh funkcionalnih testov (test fluorescence in test zamika elektroforezne mobilnosti) lahko zaključimo, da sta mCitrine in AZPA4 ohranila svojo nativno strukturo. Enako lahko sklenemo za RLuc.

5.1.3 Produkcija karotenoidov ob prisotnosti programske DNA

5.1.3.1 Izbor DNA vezavnih domen

Paleta DNA vezavnih motivov je zelo široka (sl. 20). Za cinkove prste smo se odločili zaradi dejstva, da so številne DiCP že okarakterizirane, njihova modularnost pa omogoča načrtovanje DiCP z novimi specifičnosti. Danes jih je okarakteriziranih že vsaj 700, kar je precej več kot bi jih potrebovali za prostorsko urejanje še tako kompleksne biosintezne poti. Različni cinkovi prsti imajo tudi primerljive afinitete za DNA, v celici se zaradi podobne strukture podobno zvijajo in so primerljivo stabilni. Izbor je vključeval DiCP, ki niso toksične, vežejo ortogonalna zaporedja in so že kdaj delovale (pregl. 2).

5.1.3.2 Vpliv domen iz cinkovih prstov na delovanje encimov

Kljub pripetim DiCP so encimi karotenoidne biosintezne poti ostali funkcionalni (sl. 79 in 80). Identiteto nastalih spojin smo dodatno potrdili s HPLC (sl. 86, 87 in 88). Nismo pa preverili, ali morda fuzija z DiCP zniža aktivnost encimov. V ta namen bi morali pripraviti operone brez DiCP in produkcijo karotenoidov primerjati s produkcijo v celicah, ki nosijo plazmid z operonom z geni za fuzijske proteine. Takšna primerjava je pomembna, če želimo razmišljati o industrijski viabilnosti sistema (npr. lahko bi se izkazalo, da so absolutne količine nastalih spojin v primeru prostih encimov brez DiCP vselej večje – zaradi nižje aktivnosti encimov z DiCP).

Če bi programska DNA v primeru s fuzijskimi proteini povečala produkcijo tarčne spojine, ta pa bi bila nižja kot v sistemu s prostimi encimi brez DiCP, to iz stališča konkurenčnosti ne bi bil ustrezen sistem (vsaj v oziru tiste specifične biosintezne poti).

5.1.3.3 Izbor biosintezne poti

Pomembno vprašanje je, ali nemara uporabljeni encimi v E. coli že sami po sebi ne tvorijo multiencimskega kompleksa. Glede na dejstvo, da so vsi iz istega organizma (Pantoea ananatis), bi to morda lahko pričakovali. To ugibanje izvira tudi iz podatka, da se karotenoidi, vsaj tisti izrazito nepolarni, v E. coli nalagajo v membranah (Borel in sod., 1996; Lee in Schmidt-Dannert, 2002). Cunningham in Gantt (1998) ter Britton (1998) predlagajo, da je učinkovita biosinteza karotenoidov posledica nastanka membransko vezanega multiencimskega kompleksa. V tem primeru uporaba programske DNA za izboljšano produkcijo karotenoidov verjetno ne bi bila smiselna, ker bi encimi že bili v najbolj ugodni »biosintezni konformaciji«, prav tako bi njihova difuzija že bila omejena na dve razsežnosti. Ni pa seveda nujno, da multiencimski kompleks tvorijo tudi v heterolognem gostitelju. Prav tako je možno, da fuzija encimov z DiCP onemogoči njihovo vsidranje v membrano ali pa prepreči njihove medsebojne interakcije. V tem primeru je uporaba programske DNA smiselna, vprašanje pa je, ali lahko potem takšen pristop vodi v industrijsko uporabne produkcijske titre. Da bi preverili, ali encimi res tvorijo multiencimski kompleks, bi jim morali dodati različne peptidne oznake (npr. His, HA, S, FLAG, Myc idr.) in izvesti koimunoprecipitacijo.

Najbolj optimalen izbor bi verjetno vključeval vodotopne encime iz filogentsko oddaljenih vrst, ki so originalno vključeni v različne biosintezne poti. To bi do največje mere zmanjšalo verjetnost za njihovo spontano asociacijo v multiencimski kompleks v heterolognem gostitelju, zaradi njihove lokalizacije v citosolu pa bi ob prisotnosti programske DNA encimom odvzeli dve prostostni stopnji, kar bi vodilo v izboljšano produkcijo tarčne spojine.

5.1.3.4 Programska DNA vodi v izboljšano produkcijo karotenoidov

Ob prisotnosti 16 kopij programske DNA z 2 bp vmesnikom (sl. 81) je nastalo približno 4krat več likopena kot v primeru prostih encimov ob prisotnosti kontrolnega plazmida brez vezalnih mest (sl. 82). Tudi v primeru biosinteze β -karotena je prisotnost programske DNA (sl. 83) izboljšala produkcijo spojine: približno 3,5-krat v primeru 2 bp vmesnika in 2,5krat v primeru 4 bp vmesnika (sl. 84). Produkcijski titer β -karotena v prisotnosti 8 bp vmesnika je bil nižji kot v kontrolnem sistemu. Razlog zato je morda v različnih rastnih fazah kultur, iz katerih smo ekstrahirali β -karoten: kontrolne celice so bile ob ekstrakciji že v stacionarni fazi (pril. I). Vpliv neenakomerne rasti kultur smo izničili z normalizacijo produkcije spojin na optično gostoto kultur pri 600 nm. Na ta način smo lahko rezultate produkcije primerjali med seboj. Povečanje produkcije likopena in β -karotena je podobno izmerjenemu povečanju produkcije pri treh drugih biosinteznih verigah (Conrado in sod., 2012).

5.1.3.5 Vpliv dolžine vmesnika

V primeru biosinteze β -karotena ob prisotnosti programske DNA je dolžina vmesnika narekovala končno produkcijo spojine (najboljša pri 2 bp, slabša pri 4 bp in najslabša pri 8 bp vmesniku; sl. 84). Ob dejstvu, da vezava triprstne DiCP lokalno nekoliko razvije DNA (na približno 11 bp na obrat), 2 bp pomeni idealno razdaljo med vezalnimi mesti in torej vezavo fuzijskih proteinov na isto stran programske DNA (sl. 90). V primeru 4 bp in 8 bp vmesnikov so aktivna mesta encimov zaradi neoptimalne vezave bolj oddaljena in učinek kopičenja je manjši (4 bp) oziroma ga sploh ni (8 bp). Morda bi podaljšanje vmesnika na 10 ali 11 bp ponovno vodilo v izboljšanje produkcije. Vpliv dolžine vmesnika je drugačen kot pri biosintezi drugih spojin, kar je morda posledica dejstva, da so reakcijski intermediati bolj hidrofobni in najbrž porazdeljeni v membrani.



Slika 90: Vpliv dolžine vmesnika na arhitekturo vezave fuzijskih proteinov. Z rdečo in zeleno sta označeni dve DiCP, e_1 in e_2 sta encima biosintezne poti. V primeru 2 bp vmesnika med vezalnimi mesti za fuzijske proteine, se le-ti vežejo na isto stran, kar omogoči učinkovitejše usmerjanje substrata in vmesnih produktov med približanimi aktivnimi mesti encimov. 4 bp in 8 bp vmesnika nista optimalna – razdalja med aktivnimi mesti encimov je večja, produkcija pa zato slabša.

5.1.3.6 Izbor promotorja in produkcijskega organizma

V diplomskem delu smo inducibilni pBAD promotor uporabljali v dveh različnih sevih *E. coli*: DH5 α (za produkcijo likopena) in BW27783 (za produkcijo β -karotena). Čeprav je bilo povečanje produkcije spojin neodvisno od uporabljenega seva, je za nadaljnje eksperimente primernejši drugi, saj omogoča inducibilno izražanje encimov z DiCP v celotni populaciji celic, s čimer lahko nadzorujemo nivo izražanja encimov v celicah. Tega sev DH5 α ne omogoča, saj so encimi zaradi pozitivne povratne zanke, ki poganja pBAD promotor, vedno maksimalno izraženi, prav tako pa ne v vseh celicah (glej pogl. 4.3.1.1.2.1 in 4.3.3.2 ter pril. J). V oziru dejanske uporabnosti programske DNA pa je

seveda naslednji izziv izboljšava industrijskega seva, ki je že optimiran s tradicionalnimi pristopi metabolnega inženiringa.

5.1.3.7 Razmerje med številom fuzijskih proteinov in številom vezalnih mest na programski DNA

Za uporabnost programske DNA pri izboljševanju biosinteznih poti, število vezalnih mest na programski DNA ne sme biti omejujoč dejavnik. Idealen sistem torej vključuje maksimalno izražene fuzijske proteine (tako da za celice še niso toksični in ne vplivajo na njihovo rast) vezane na programsko DNA. Število vezalnih mest za encime lahko nadzorujemo na dva načina: s številom ponovitev programske DNA vključene v plazmid in z uporabo plazmida v inducibilnem številu kopij. Število encimov (oz. natančneje fuzij encimov z DiCP) pa z inducibilnim promotorjem in vključitvijo na plazmid v majhnem ali velikem številu kopij. V naših eksperimentih smo se odločili, da fuzijske proteine vključimo v plazmid v majhnem številu kopij (pSB4C5, sliki 42 in 75). Predpostavili smo, da bi ob vključitvi genov za fuzijske proteine v plazmid v velikem številu kopij, njihovo število v celici preseglo število vezalnih mest zanje, s čimer bi izničili učinek programske DNA (število prostih encimov bi bilo veliko v primerjavi s številom vezanih).

Sistem je neoptimalen, tudi če količina vezalnih mest preseže količino encimov (sl. 91). V tem primeru se encimi vežejo na različna ogrodja, pri čemer nekatera mesta ostanejo nezasedena. Takšen učinek DNA ogrodja so opazili Stains in sod. (2005). Z večanjem koncentracije tarčne DNA za rekonstitucijo cepljenega fluorescenčnega proteina je fluorescenca padala. V okviru diplomskega dela nam ni uspelo kvantitativno ovrednotiti sistema biosinteze karotenoidov na programski DNA. V ta namen bi morali fuzijske proteine označiti z različnimi peptidnimi oznakami in izvesti kvantitativni Western prenos. Prav tako bi morali z kvantitativnim PCR določiti količino plazmida s programsko DNA, isto metodo pa bi lahko uporabili tudi za spremljanje količine plazmidov med produkcijo, s čimer bi videli, v kakšni meri jih bakterije izmetujejo, če sploh jih (to bi se lahko zgodilo zaradi porabljenega antibiotika). Po takšni seriji eksperimentov bi lahko ocenili, ali je razmerje med encimi in vezalnimi mesti ustrezno in posledično še dodatno optimizirali pogoje.



Slika 91: Slabost kopičenja proteinov na sintetičnih ogrodjih (Good in sod., 2011). Sintetični biološki sistem z ogrodjem za prostorsko usmerjeno kopičenje proteinov ni optimalen, če je koncentracija ogrodja majhna ali velika v primerjavi s proteini. V prvem primeru je fizična interakcija proteinov naključna, v drugem primeru pa se posamezni proteini v zaporedju reakcij razporedijo na različna ogrodja, kar tudi zmanjša učinkovitost sistema.

V naših eksperimentih je bila programska DNA prisotna na plazmidu v velikem številu kopij (sl. 40 in 73). V plazmid je bilo vključenih 16 kopij programske DNA, kar pomeni med 1600 in 4800 vezalnih mest za posamezni fuzijski protein (če predpostavimo, da veliko število kopij pomeni 100–300 kopij). Zaznali smo povečano produkcijo obeh spojin (likopena in β -karotena), zato sklepamo, da je bilo razmerje med encimi in vezalnimi mesti v sistemu blizu optimalne (sl. 91).

5.1.3.8 Primerjava programske DNA z ostalimi sinteznobiološkimi pristopi za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov

Direktna fuzija encimov lahko vodi v nepravilno zvitje le-teh in/ali proteolizo. Možnost za takšne težave je večja, če je v fuzijo vključenih več encimov. Proteinska ogrodja encimov ne uredijo v predvidljivo orientirane skupke, prav tako je število dimerizacijskih domen omejeno. Načrtovanje RNA ogrodij za prostorsko urejeno kopičenje več kot dveh encimov je kompleksno, število primernih aptamer vezavnih domen pa omejeno. Obema je skupno, da se njuna zvitje in stabilnost spreminjata od enega dizajna do drugega. Iz omenjenih dejstev sledi, da proteinska in RNA ogrodja verjetno niso primerna za kopičenje encimov kompleksnejših, večencimskih biosinteznih poti. Programska DNA uspešno naslavlja vse naštete težave. DNA ima zelo predvidljivo lokalno strukturo, kar pomeni, da je končna struktura ogrodja neodvisna od dizajna. DNA ogrodje je tudi zelo stabilno in vivo, v veliki meri neodvisno od DNA zaporedja. Omogoča fino uravnavanje stehiometrije vezalnih mest, števila ponovitev programske DNA, arhitekture vezave DiCP s spreminjanjem dolžine vmesnika med njimi, položaja vezalnih mest na plazmidu, števila kopij plazmida ... Vse našteto so prostostne stopnje, s katerimi lahko razpolagamo pri optimizacji sistema. Kljub vsemu ima programska DNA nekaj slabosti. Prvi problem predstavlja superzvitje plazmidne DNA v celici, kar bi lahko vplivalo na dostopnost vezalnih mest za fuzijske proteine. Tega problema ne bi rešili niti z vključitvijo programske DNA v kromosom E. coli, saj je le-ta prav tako superzvit. Integracija programske DNA v genom bi prav tako otežila ohranjanje vseh prostostnih stopenj, ki jih ponuja plazmid. Vsekakor pa s tem omogočimo njeno stabilnejše prenašanje v hčerinske celice. Drugi problem izhaja iz ponavljajočih se DNA zaporedij pri večkratni ponovitvi programske DNA na plazmidu. Takšna zaporedja so zelo nestabilna in občutljiva na rekombinacijo (Bzymek in Lovett, 2001), kar lahko delno rešimo z uporabo sevov z izbitim genom za RecA rekombinazo (obstajajo namreč tudi od RecA neodvisni mehanizmi reorganizacije ponavljajočih se DNA zaporedij).

5.2 SKLEPI

- Fuzijski proteini cCFP-HivC, Gli1-nCFP, cYFP-Zif268 in PBSII-nYFP kolokalizirajo v jedru HEK293 celic, kjer se rekonstituirajo v funkcionalna fluorescenčna proteina mCerulean in mCitrine.
- Z metodo bledenja akceptorja (FRET AB) smo zaznali FRET med rekonstituiranima fluorescenčnima proteinoma, kar je verjetno posledica vezave na programsko DNA. Menimo, da bi sistem lahko optimizirali.
- Maltoza vezalni protein (MBP) izboljša topnost proteinov, ki vsebujejo DiCP.
- S funkcionalnimi testi smo pokazali, da bi proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in MBP-RLuc-2C7-8xHis lahko uporabili za funkcionalizacijo DNA origamija.
 - MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis:
 - spletno programsko orodje K2d je na osnovi eksperimentalnih vrednosti cirkularnega dikroizma proteina podalo nezanesljivo oceno deležev sekundarnih struktur v njem
 - z DLS smo pokazali, da je hidrodinamski radij proteina okoli 30 nm, kar je več od pričakovanega in je verjetno posledica agregacije proteina
 - s testom zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA) smo pokazali vezavo proteina na vse tri vezalne oligonukleotide, ki smo jih predvideli za vključitev v DNA origami ploščico
 - vezava je bila specifična, saj se protein ni vezal na oligonukleotid z vezalnim mestom za ortogonalno DiCP 6F6
 - afiniteta vezave (v μM območju) je bila manjša od že poročane (sub-pM)
 - protein je fluoresciral
 - MBP-RLuc-2C7-8xHis
 - RLuc je ohranila encimsko aktivnost po dodatku substrata koelenterazina v supernatant s proteinom smo zaznali bioluminiscenco
- Fuzija encimov karotenoidne biosintezne poti iz bakterije *Pantoea ananatis* z DiCP ne vpliva na njihovo funkcionalnost.
- Z vnosom operonov z ustrezno kombinacijo genov za heterologne encime CrtE, CrtB, CrtI, CrtY in CrtZ s pripadajočimi DiCP v dva različna seva *E. coli* (DH5α in BW27783) smo pokazali produkcijo treh karotenoidov, od tega dveh karotenov (likopena in β-karotena) in enega ksantofila (zeaksantina).
- Identiteto spojin smo določili in dokazali z oceno barve produkcijskih kultur, celičnih peletov in ekstraktov, spektrofotometrično ter s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Slednjo smo uporabili tudi za kvantifikacijo likopena in β-karotena v ekstraktih.
- Čistota likopena in β-karotena sta bili primerljivi s čistoto standardov obeh spojin.
- V prisotnosti 16 ponovitev programske DNA z 2 bp vmesnikom je nastalo približno 4krat več likopena in 3,5-krat več β -karotena kot v prisotnosti kontrolnega plazmida brez vezalnih mest za DiCP.

Dolžina vmesnika vpliva na produkcijo heterologne spojine. 2 bp vmesnik zagotavlja optimalno arhitekturo vezave fuzijskih proteinov na programsko DNA – encimi se kopičijo na isti strani molekule DNA. Ta učinek smo pokazali na primeru biosinteze β-karotena. Izkazalo se je, da 4 bp vmesnik (pri 16 ponovitvah programske DNA) zmanjša povečanje produkcije, pri 8 bp vmesniku pa je bila produkcija primerljiva s kontrolo.

5.3 POGLED V PRIHODNOST

Mei in sod. (2011) poročajo o stabilnosti DNA origamija v celičnem lizatu, Pinheiro in sod. (2011) pa o njegovi uporabi za prostorsko organizacijo biosinteznih reakcij *in vivo*. Čeravno je opažanje Mei in sod. pomembno za izvedbo idej Pinheiro in sod., pa je trenutno bistveno vprašanje naslednje: na kakšen način doseči stabilno podvajanje takšnih DNA nanostruktur v celici? Ali je to sploh izvedljivo? Lin in sod. (2008) so sicer s pomočjo virusov že uspeli podvajati enostavne Hollidayeve križne strukture, a je to še daleč od kompleksnosti struktur, ki jih lahko pripravimo na osnovi tehnike DNA origami.



Slika 92: DNA nanostrukture kot biomimetični sistemi *in vivo* (Pinheiro in sod., 2011: 5). Podvajanje kompleksnih DNA nanostruktur *in vivo* bi lahko omogočilo prostorsko usmerjeno kopičenje endogenih in/ali heterolognih molekul (označene z rumeno, roza in modro barvo) za študij celičnih procesov in načrtovanje bioloških sistemov z izboljšanimi ali celo povsem novimi lastnostmi. Takšne DNA nanostrukture bi se lahko npr. samosestavile v pore, kanale ali črpalke, se lokalizirale na ustrezno mesto in tako v celico vnesle povsem novo komunikacijsko plast. Med drugim bi lahko delovale kot medcelično lepilo za tvorbo sintetičnih mikrobnih skupnosti.

Simmel (2012) podaja nekaj zanimivih možnosti, ki jih DNA origami ponuja za organizacijo umetnih encimskih kaskad. DNA origami npr. omogoča sistematično spreminjanje razdalj med vezanimi encimi, njihovega vrstnega reda in stehiometrije, s čimer lahko poiščemo konfiguracijo z optimalnim metabolnim fluksom. S 3D DNA origamijem pa bi bilo možno encime enkapsulirati podobno kot v naravi to storijo metabolosomi, prav tako pa zelo natančno uravnavati geometrijo vezanih encimov znotraj takšne reakcijske komore.



Slika 93: Organizacija večencimskih kaskad z DNA origamijem (Simmel, 2012: 4). DNA nanostukture kot je DNA origami ponujajo več prostorske fleksibilnosti kot enostavna linearna ogrodja. (a) Na DNA origamiju lahko sistematično preizkusimo številne encimske konfiguracije. (b) Enkapsulacija encimov v umetne organelom podobne reakcijske komore narejene iz DNA.

Podobnim futurističnim obetom strukturne DNA nanotehnologije v povezavi s prostorsko urejenim kopičenjem encimov *in vivo* se pridužujejo tudi Michelotti in sod. (2012). Skupaj s prodorom sintezne genomike (Montague in sod., 2012) so vizije Simmel (2012) in Michelotti in sod. (2012) znanilke načrtovanja novih mikrobnih katalistov s pristopom od spodaj gor.

Pomembna vprašanja z le delnimi odgovori se dotikajo tudi mehanističnih osnov delovanja obstoječih sintetičnih ogrodij za prostorsko usmerjeno kopičenje encimov. Lee in sod. (2011) njihovo delovanje vzporejajo s t.i. metabolnimi mikrodomenami kot so npr. Ca^{2+} , cAMP in ATP mikrodomene. Zanje je značilna kolokalizacija producentov metabolita (viri) in njegovih porabnikov (ponori). Pri takšni prostorski organizaciji se metabolit porabi še preden lahko oddifundira daleč stran od svojega vira. Sintetični makromolekularni kompleksi ogrodja in vezanih encimov, podobno kot metabolne mikrodomene, preprečujejo difuzijo intermediatov v raztopino, kar pomeni njihovo višjo lokalno koncentracijo, posledično pa manj neželenih interakcij z ostalimi sestavinami gostiteljevega metabolizma. Izpostavljajo dva ključna parametra, ki sta osnova kvantitativnemu ovrednotenju mehanizma delovanja ogrodij: hitrost porabe (k) in difuzijski koeficient intermediata (D). Večji kot je k in manjši kot je D, lažje je intermediat zadržati v majhnem volumnu. Na tej osnovi so izpeljali model, ki predvideva multimerizacijo številnih ogrodij z vezanimi encimi v t.i. intermediatne mikrodomene, kar pa je mogoče le, če encimi (ali ogrodje) oligomerizirajo. Ta hipoteza ponovno izhaja iz narave, kjer najdemo vsaj dva zgleda multimerizacije ogrodij in proteinov: postsinaptična gostota (PSD) in cAMP mikrodomena. Odtod bi torej sledilo, da so za kopičenje na plazmidni programski DNA primerne tiste biosintezne poti, pri katerih vsaj eden od encimov oligomerizira. Poleg opisanega, predlagajo še nakatere druge mehanizme, npr. z ogrodjem posredovano preprečevanje agregacije encimov in dvig encimske aktivnosti. Metode, s katerimi bi lahko vsa ta predvidevanja preizkusili, pa so različni kinetični testi, elektronska mikroskopija, fluorescenčni biosenzorji idr.

Zanimivo bi bilo primerjati izkoristke ene biosintezne poti organizirane na vseh treh obstoječih ogrodjih, s čimer bi bili korak bližje odgovoru na vprašanje, katero je najboljše. Če vzamemo hipotetičen primer, kjer bi v celicah s temi tremi tipi ogrodij imeli enako število vezalnih mest in encimov, potem bi pričakovali, da je maksimalna produkcija tarčne spojine pri optimalnih pogojih (količina hranil, kisika ...) v veliki meri odvisna od stabilnosti kompleksa ogrodje-encimi, torej časa, ki ga encimi »preživijo« v obliki intermediatne mikrodomene. To lahko prevedemo v stabilnost interakcij med fuzijskimi proteini in vezalnimi mesti zanje oziroma v konstanto vezave posameznega liganda na ogrodje. Torej bi v tem primeru bolj kot sam tip ogrodja bil pomemben ligand za vezavo nanj. V tem oziru bi idealno ogrodje omogočalo kovalentno vezavo encimov. Boock (2011) se ukvarja s kovalentnim zamreženjem encimov *in vivo* s pomočjo sortaze A, zanimive obete v to smer pa morda ponuja tudi biokonjugacija na osnovi »klik« kemije (Beal in Jones, 2012).

6 POVZETEK

Sintezni biolog iz rešitev, ki jih ponuja narava, črpa ideje za načrtovanje sintetičnih bioloških sistemov, ki v delovne organizme vnašajo povsem nove funkcionalnosti. V diplomskem delu smo eno takšnih naravnih rešitev posnemali tudi sami.

Znano je, da se encimi številnih metabolnih poti urejajo v multiencimske komplekse. Fizična asociacija encimov in s tem bližina aktivnih mest je pomembna iz več razlogov: verjetnost, da vmesni produkti stopijo v stranske reakcije, je manjša, celica zavaruje ostale znotrajcelične komponente pred toksičnimi intermediati, pretvorba substrata v končni produkt pa je tako učinkovitejša. Naravni sistemi, ki na takšen način optimizirajo metabolne procese, med drugim vključujejo bakterijske mikrorazdelke, encime z metabolnimi tuneli in multiencimske komplekse biosinteznih poti (npr. modularne poliketid sintaze).

Prvi sinteznobiološki pristopi, ki so posnemali takšno naravno organizacijo encimov, so bile direktne fuzije encimov. V zadnjih treh letih pa so se v sinteznobiološki skupnosti pojavili trije novi pristopi, ki vključujejo proteinska, RNA in DNA ogrodja. Vsem trem je skupna priprava encimov v obliki fuzije z ligandom, kar po njihovi vezavi na specifična mesta v sintetičnem ogrodju vodi v izboljšano produkcijo tarčne spojine. Proteinska in RNA ogrodja imajo nekatere pomanjkljivosti, DNA pa pred njima nekaj ključnih prednosti, ki se nanašajo predvsem na njeno predvidljivo lokalno strukturo in številne že okarakterizirane DNA vezavne domene.

V diplomskem delu smo se osredotočili na izboljšanje karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov. Najprej smo preverili, ali se izbrane DiCP vežejo na svoja tarčna zaporedja. Pripravili smo plazmidne vektorje z geni za fuzijske proteine med cepljenimi fluorescenčnimi proteini in DiCP (cCFP-HivC, Gli1-nCFP, cYFP-Zif268 in PBSII-nYFP) ter plazmidni vektor s programsko DNA z vezalnimi mesti zanje. Po kotransfekciji vseh petih plazmidov v HEK293 celice smo pokazali, da proteini kolokalizirajo v jedru, kjer se cepljeni fragmenti po vezavi na programsko DNA sestavijo v funkcionalne fluorescenčne proteine. Z pomočjo laserske konfokalne mikroskopije in metode bledenja akceptorja (FRET AB) smo med rekonstituiranima fluorescenčnima proteinoma zaznali prenos energije z resonanco fluorescence (FRET).

Po dodatku domene za izboljšano topnost (MBP) smo uspešno izolirali in okarakterizirali dva proteina z DiCP: MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis in MBP-RLuc-2C7-8xHis. Z njima bi lahko s pomočjo prenosa energije z resonanco bioluminiscence (BRET) pokazali princip prostorsko usmerjene vezave proteinov na DNA origami, ki razširja pojem DNA ogrodij v 2 in 3 razsežnosti. MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis se je specifično vezal na vezalne oligonukleotide, ki smo jih načrtovali za vključitev v DNA origami ploščico, z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS) smo določili njegovo velikost (\approx 30 nm), s cirkularnim dikroizmom (CD) in analizo s programom K2d pa smo ocenili še prisotnost sekundarnih struktur v njem. Protein je fluoresciral. Drugi, MBP-RLuc-2C7-8xHis, je ohranil encimsko aktivnost, ki jo nosi *Renilla* luciferaza (RLuc). Z luciferaznim testom smo v supernatantu s proteinom zaznali bioluminiscenco kot posledico oksidativne dekarboksilacije koelenterazina h v koelenteramid. Končno smo pripravili tri plazmidne vektorje z operoni za biosintezo dveh karotenov likopena in β-karotena – in enega ksantofila – zeaksantina. Gene za encime (CrtE – GGPP sintaza, CrtB – fitoen sintaza, CrtI – fitoen desaturaza, CrtY – likopen β-ciklaza in CrtZ – β-karoten hidrokislaza) smo spojili z geni za izbrane domene iz cinkovih prstov (triprstne Jazz, Blues, Zif268 in PBSII ter petprstna Gli1) in jih sestavili v funkcionalne operone. Pripravili smo tudi DNA ogrodja s 16 ponovitvami programske DNA in različnimi dolžinami vmesnika med vezalnimi mesti (2, 4 in 8 bp). V celicah E. coli smo pokazali 4kratno povečanje produkcije likopena v prisotnosti programske DNA z 2 bp vmesnikom, v prisotnosti enakega tipa DNA ogrodja pa tudi 3,5-kratno povečanje produkcije β-karotena v primerjavi s kontrolo, kjer so bili encimi prosti v citoplazmi. Opazili smo, da razdalja med vezalnimi mesti, verjetno zaradi arhitekture vezave fuzijskih proteinov na programsko DNA, vpliva na končne produkcijske titre. V primeru biosinteze β-karotena je bilo povečanje produkcije ob prisotnosti programske DNA s 4 bp vmesnikom manjše, v primeru programske DNA z 8 bp vmesnikom pa je bila produkcija primerljiva s tisto v kontrolni kulturi. Identiteto in količino nastalih karotenoidov smo določili s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivostjo (HPLC), spektrofotometrično in na osnovi obarvanosti produkcijskih kultur, celičnih peletov in ekstraktov.

Predvidevamo, da bi DNA origami v prihodnje lahko bil pomemben element pri načrtovanju še kompleksnejših sintetičnih bioloških sistemov za izboljšano produkcijo spojin, kar potrjuje tudi literatura.



Slika 94: Grafični povzetek diplomskega dela. V diplomskem delu smo pokazali od programske DNA odvisno izboljšanje produkcije dveh karotenoidov – likopena in β -karotena – ter funkcionalnost operona za zeaksantin. Z rekonstitucijo cepljenih fluorescenčnih proteinov in FRET-om med njima smo pokazali princip delovanja takšnih sintetičnih bioloških sistemov. Okarakterizirali smo tudi dva proteina za funkcionalizacijo DNA origamija, ki razširja pojem DNA ogrodij v več dimenzij, v prihodnosti pa bi lahko predstavljal osnovo za načrtovanje še kompleksnejših sistemov kopičenja encimov biosinteznih poti.

7 VIRI

[A]

- 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
- Alexa A., Varga J., Reményi A. 2010. Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Journal, 277, 21: 4376–82
- An S., Deng Y., Tomsho J.W., Kyoung M., Benkovic S.J. 2010b. Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 107, 29: 12872–12876
- An S., Kumar R., Sheets E.D., Benkovic S.J. 2008. Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells. Science, 320, 5872: 103–106
- An S., Kyoung M., Allen J.J., Shokat K.M., Benkovic S.J. 2010a. Dynamic Regulation of a Metabolic Multi-enzyme Complex by Protein Kinase CK2. The Journal of Biological Chemistry, 285, 15: 11093–11099
- Andersen E.S., Dong M., Nielsen M.M., Jahn K., Subramani R., Mamdouh W., Golas M.M., Sandern B., Stark H., Oliveira C.L.P., Pedersen J.S., Birkedal V., Besenbacher F., Gothelf K.V., Kjems J. 2009. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. Nature, 459, 7243: 73–76
- Andrade M.A., Chacón J.J., Merelo J.J., Morán F. 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. Protein Engineering, 6, 4: 383–390
- Ayoub M.A., Pfleger K.D.G. 2010. Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. Current Opinion in Pharmacology, 10, 1: 44–52

[**B**]

- Bacher A., Baur R., Eggers U., Harders H.D., Karl Otto M., Schnepple H. 1980. Riboflavin Synthases of *Bacillus subtilis* PURIFICATION AND PROPERTIES. The Journal of Biological Chemistry, 255, 2: 632–637
- Bae K.-H., Kwon Y.D., Shin H.-C., Hwang M.-S., Ryu E.-H., Park K.-S., Yang H.-Y., Lee D., Lee Y., Park J., Kwon H.S., Kim H.-W., Yeh B., Lee H.-W., Sohn S.H., Yoon J., Seol W., Kim J.S. 2003. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. Nature Biotechnology, 21, 3: 275–280

- Bardwell L. 2008. Signal Transduction: Turning a Switch into a Rheostat. Current Biology, 18, 19: 910–912
- Bayer E.A., Belaich J.-P., Shoham Y., Lamed R. 2004. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. Annual Review of Microbiology, 58: 521–554
- BCC Research. 2011. The Global Market for Carotenoids (FOD025D). http://www.bccresearch.com/report/carotenoids-global-market-fod025d.html (4. maj 2012)
- Beal D.M., Jones L.H. 2012. Molecular Scaffolds Using Multiple Orthogonal Conjugations: Applications in Chemical Biology and Drug Discovery. Angewandte Chemie International Edition, vnaprejšnja objava na spletu pred tiskom http://dx.doi.org/10.1002/anie.201200002 (1. maj 2012)
- Berg J.M. 1988. Proposed structure for the zinc binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 85, 1: 99–102
- BIOMOD team Slovenia 2011. DNA origami add-ons. 2011. Kemijski inštitut, Ljubljana. http://openwetware.org/wiki/Biomod/2011/Slovenia/BioNanoWizards (28. apr. 2011)
- Bobik T. 2006. Polyhedral organelles compartmenting bacterial metabolic processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 70, 5: 517–525
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-type III Effectors. Science, 326, 5959: 1509–1519
- Bogdanove A.J., Voytas D.F. 2011. TAL effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. Science, 333, 6051: 1843–1846
- Bonacci W., Teng P.K., Afonso B., Niederholtmeyer H., Grob P., Silvera P.A., Savage D.S. 2012. Modularity of a carbon-fixing protein organelle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 109, 2: 478–483
- Boock J. 2011. »Kovalentna vezava encimov *in vivo* s sortazo A.« Cornell University, Itacha, ZDA. jtb92@cornell.edu (osebni vir, avgust 2011)
- Borel P., Grolier P., Armand M., Partier A., Lafont H., Lairon D., Azais-Braesco V. 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. The Journal of Lipid Research, 37, 2: 250–261

- Brayer K.J., Segal D.J. 2008. Keep Your Fingers Off My DNA: Protein-Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains. Cell Biochemistry and Biophysics, 50, 3: 111–131
- Britton G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. V: Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism, vol 3. Britton G., Pfander H., Liaaen-Jensen S. (eds.). Basel, Birhäuser Verlag: 13–147
- Bratkovič T. 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 5: 749–767
- Bzymek M., Lovett S.T. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 98, 15: 8319–8325

[C]

- Castro C.E., Kilchherr F., Kim D.N., Shiao E.L., Wauer T., Wortmann P., Bathe M., Dietz H. 2011. A primer to scaffolded DNA origami. Nature Methods, 8, 3: 221–229
- Chhabra R., Sharma J., Ke Y., Liu Y., Rinker S., Lindsay S., Yan H. 2007. Spatially Addressable Multiprotein Nanoarrays Templated by Aptamer-Tagged DNA Nanoarchitectures. Journal of the American Chemical Society (JACS), 129, 34: 10304 –10305
- Charles I.G., Keyte J.W., Brammar W.J., Smith M., Hawkins A.R. 1986. The isolation and nucleotide sequence of the complex *AROM* locus of *Aspergilus nidulans*. Nucleic Acids Research, 14, 5: 2201–2213
- Cheng S., Liu Y., Crowley C.S., Yeates T.O., Bobik T.A. 2008. Bacterial microcompartments: their properties and paradoxes. BioEssays, 30, 11–12: 1084–1095
- Choo Y., Klug A. 1995. Designing DNA-binding proteins on the surface of filamentous phage. Current Opinion in Biotechnology, 6, 4: 431–436
- Conrado R.J., Mansell T.J., Varner J.D., DeLisa M.P. 2007. Stochastic reaction-diffusion simulation of enzyme compartmentalization reveals improved catalytic efficiency for a synthetic metabolic pathway. Metabolic Engineering, 9, 4: 355–363
- Conrado R.J., Varner J.D., DeLisa M.P. 2008. Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy. Current Opinion in Biotechnology, 19, 5: 492–499
- Conrado R. J., Wu G.C., Boock J.T., Xu H., Chen, S.Y., Lebar T., Turnšek J., Tomšič N., Avbelj M., Gaber R., Koprivnjak T., Mori J., Glavnik V., Vovk I., Benčina M., Hodnik V., Anderluh G., Dueber J.E., Jerala R., DeLisa M.P. 2012. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. Nucleic Acids Research, 40, 4: 1879–1889

- Corbi N., Libri V., Faniculli M., Tinsley J.M., Davies K.E., Passananti C. 2000. The artificial zinc finger coding gene 'Jazz' binds the utrophin promoter and activates transcription. Gene Therapy, 7, 12: 1076–1083
- Coutinho T.A., Venter S.N. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. Molecular Plant Pathology, 10, 3: 325–335
- Cunningham F.X., Gantt E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 557–583

[**D**]

- Dao-Thi M.-H., Van Melderen L., De Genst E., Afif H., Buts L., Wyns L., Loris R. 2005. Molecular Basis of Gyrase Poisoning by the Addiction Toxin CcdB. Journal of Molecular Biology, 348, 5: 1091–1102
- Das A., Yoon S.H., Lee S.H., Kim J.Y., Oh D.K., Kim S.W. 2007. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. Applied Microbiology and Biotechnology, 77, 3: 505–512
- DeLisa M.P., Conrado R.J. 2009. Synthetic metabolic pipelines. Nature Biotechnology, 27, 8: 728–729
- Delebecque C.J., Lindner A.B., Silver P.A, Aldaye, F.A. 2011. Organization of Intracellular Reactions with Rationally Designed RNA Assemblies. Science, 333, 6041: 470–474
- Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.-K., Shi Y., Yan N. 2012. Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of DNA by TAL Effectors. Science, 335, 6069: 720–723
- Doi R.H., Kosugi A. 2004. Cellulosomes: Plant-cell-wall degrading enzyme complexes. Nature Reviews Microbiology, 2, 7: 541–551
- Douglas S.M., Marblestone A.H., Teerapittayanon S., Vazquez A., Church G.M., Shih W.M. 2009. Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. Nucleic Acids Research, 37, 15: 5001–5006
- Dragulescu-Andrasi A., Chan C.T., De A., Massoud T.F., Gambhir S.S. 2011. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein–protein interactions within deep tissues of living subjects. 108, 29: 12060–12065
- Drews G., Niklowitz W. 1956. Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Zentroplasma und granulare Einschlüsse von *Phormidium uncinatum*. Archives of Microbiology, 24: 147–162

Dueber J.E., Wu G.C., Malmirchegini G.R., Moon T.S., Petzold C.J., Ullal A.V., Prather K.L.J., Keasling J.D. 2009. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nature Biotechnology, 27, 8: 753–759

[E]

- Elcock A.H., Potter M.J., Matthews D.A., Knighton D.R., McCammon J.A. 1996. Electrostatic Channeling in the Bifunctional Enzyme Dihydrofolate Reductasethymidylate Synthase. Journal of Molecular Biology, 262, 3: 370–374
- Elouahabi A., Ruysschaert J.-M. 2005. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. Molecular Therapy, 11, 3: 336–347
- Elrod-Erickson M., Rould M.A., Nekludova L., Pabo C.O. 1996. Zif268 protein–DNA complex refined at 1.6Å: a model system for understanding zinc finger–DNA interactions. Structure, 4, 10: 1171–1180
- Engelke D.R., Ng S.-Y., Shastry B.S., Roeder R.G. 1980. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. Cell, 19, 3: 717–728.
- Eriksson H.M., Wessman P., Ge C., Edwards K., Wieslander Å. 2009. Massive Formation of Intracellular Membrane Vesicles in *Escherichia coli* by a Monotopic Membranebound Lipid Glycosyltransferase. The Journal of Biological Chemistry, 284, 49: 33904 -33914

[**F**]

- 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 microcompartments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 107, 16: 7509–7514
- Fierobe H.P., Bayer E.A., Tardif C., Czjzek M., Mechaly A., Bélaïch A., Lamed R., Shoham Y., Bélaïch J.P. 2002. Degradation of Cellulose Substrates by Cellulosome Chimeras. The Journal of Biological Chemistry, 277, 51: 49621–49630
- Fox J.D., Routzahn K.M., Bucher M.H., Waugh D.S. 2003. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 537, 1–3: 53–57
- Fox J.D., Waugh D.S. 2002. Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer. V: *E. coli* Gene Expression Protocols; Methods in Molecular Biology, Volume 205. Vaillancourt P.E. (ed.). New York, Humana Press: 99–117
- Förster T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Annalen der Physik, 437, 1: 55–75

- Fu F., Sander J.D., Maeder M., Thibodeau-Beganny S., Joung J. K., Dobbs D., Miller L., Voytas D.F. 2009. Zinc Finger Database (ZiFDB): a repository for information on C2H2 zinc fingers and engineered zinc-finger arrays. Nucleic Acids Research, 37, Database issue: D279–D283 http://bindr.gdcb.iastate.edu:8080/ZiFDB/controller/instructions;jsessionid=CA52DBC 4FD49EC3B44A6B94C0CB89441 (28. apr. 2012)
- Fu J., Liu M., Liu Y., Woodbury N.W., Yan H. 2012. Interenzyme Substrate Diffusion for an Enzyme Cascade Organized on Spatially Addressable DNA Nanostructures. Journal of the American Chemical Society (JACS), 134, 12: 5516–5519
- Furman J.L., Badran A.H., Shen S., Stains C.I., Hannallah J., Segal D.J., Ghosh I. 2009. Systematic evaluation of split-fluorescent proteins for the direct detection of native and methylated DNA. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19, 14: 3748–3751

[G]

- Galitski T. 2012. Reductionism Gives Way to Systems Biology. Genetic Engineering&Biotechnology News, 32, 6: 1 str. http://www.genengnews.com/gen-articles/reductionism-gives-way-to-systems-biology/4044/ (10. apr. 2012)
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. V: The Proteomics Protocols Handbook. Walker J.M. (ed.). New York, Humana Press: 571–607
- Gersting S.W., Lotz-Havla A.S., Muntau A.C. 2012. Bioluminescence Resonance Energy Transfer: An Emerging Tool for the Detection of Protein–Protein Interaction in Living Cells. V: Functional Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 815. Kaufmann M., Klinger C. (eds.). New York, Humana Press: 253 –263
- Good M.C., Zalatan J.G., Lim W. 2011. Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. Science, 332, 6030: 680–686
- Greb C. Basic Principles of Luminescence. 2012a. Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Nemčija. http://www.leica-microsystems.com/science-lab/basic-principles-of-luminescence/(2. maj 2012)
- Greb C. Fluorescent Proteins Introduction and Photo Spectral Characteristics. 2012b. Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Nemčija. http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-proteins-introduction-and-photo-spectral-characteristics/ (2. maj 2012)

- Griesbeck O., Baird G.S., Campbell R.E., Zacharias D.A., Tsien R.Y. 2001. Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein. The Journal of Biological Chemistry, 276, 31: 29188–29194
- Gustafsson C., Minshull J., Govindarajan S., Ness J., Villalobos A., Welch M. 2012. Engineering genes for predictable protein expression. Protein Expression and Purification, 83, 1: 37–46
- Guzman L.-M., Belin D., Carson M.J., Beckwith J., 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. Journal of Bacteriology, 177, 14: 4121–4130

[H]

- Han D., Pal S., Nangreave J., Deng Z., Liu Y., Yan H. 2011. DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. Science, 332, 6027: 342–346
- Hanas J.S., Larabee J.L., Hocker J.R. 2005. Zinc Finger Interactions with Metals and Other Small Molecules. V: Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Celullar Function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers: 39–46
- Hasunuma T., Miyazawa S.-I., Yoshimura S., Shinzaki Y., Tomizawa K.-I., Shindo K., Choi S.-K., Misawa N., Miyake C. 2008. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. The Plant Journal, 55, 5: 857–868
- Hawkins A.R., Smith M. 1990. Domain structure and interaction within the pentafunctional arom polypeptide. European Journal of Biochemistry, 196, 3: 717–724
- Heldt D., Frank S., Seyedarabi A., Ladikis D., Parsons J.B., Warren M.J., Pickersgill R.W. 2009. Structure of a trimeric bacterial microcompartment shell protein, EtuB, associated with ethanol utilization in *Clostridium kluyveri*. Biochemical Journal, 423, 2: 199–207
- Hong H., Goel S., Cai W. 2012. In Vivo Imaging of Protein-Protein Interactions. V: Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools. Cai W., Hong H. (eds.). Rijeka, InTech: 287–304
- Horinouchi S. 2008. Combinatorial Biosynthesis of Non-bacterial and Unnatural Flavonoids, Stilbenoids and Curcuminoids by Microorganisms. Journal of Antibiotics, 61, 12: 709–728
- Hu C.-D., Kerppola T.K. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. Nature Biotechnology, 21, 5: 539–545
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD Visual Molecular Dynamics. Journal of Molecular Graphics, 14, 1: 33–38

Hyde C.C., Ahmed S.A., Padlan E.A., Miles E.W., Davies D.R. 1988. Three-dimensional Structure of the Tryptophan Synthase $\alpha_2\beta_2$ Multienzyme Complex from *Salmonella typhimurium*. The Journal of Biological Chemistry, 263, 33, 17857–17871

[I]

iGEM team SLOVENIA 2010. Binding studies – β GAL. 2010a. Kemijski inštitut, Ljubljana.

http://2010.igem.org/Team:Slovenia/PROJECT/proof/studies/betagal (30. apr. 2012)

- iGEM team SLOVENIA 2010. Protocols cloning&proteins. 2010b. Kemijski inštitut, Ljubljana. http://2010.igem.org/Team:Slovenia/METHODS_and_PARTS/protocols#Protein_expr ession_and_isolation_protocol (15. apr. 2012)
- Isalan M., Choo Y., Klug A. 1997. Synergy between adjacent zinc fingers in sequencespecific DNA recognition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). 94, 11: 5617–5621
- Iuchi S., Kuldell N. 2005. PREFACE. V: Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Celullar Function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers
- Iuchi S. 2005. C₂H₂ Zinc Fingers As DNA Binding Domains. V: Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Celullar Function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers: 7–13

[J]

- Jayakanthan M., Muthukumaran M., Chandrasekar S., Chawla K., Punetha A., Sundar D. 2009. ZifBASE: a database of zinc finger proteins and associated resources. BioMed Central (BMC) Genomics, 10, 421 http://web.iitd.ac.in/~sundar/zifbase/login.php (28. apr. 2012)
- Joung J.K., Ramm E.I., Pabo C.O. 2000. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein–DNA and protein–protein interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 97, 13: 7382–7387

[K]

- Kaiser P., Surmann P., Vallentin G., Fuhrmann H. 2007. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. Journal of Microbiological Methods, 70, 1: 142–149
- Kapust R.B., Waugh D.S. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. Protein Science, 8, 8: 1668–1674
- Keasling J.D. 2010. Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering. Science, 330, 6009: 1355–1358

- Kecht S., Ricklin D., Eberle A.N., Ernst B. 2009. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. Journal of Molecular Recognition, 22, 4: 270–278
- Kerfeld C.A., Greenleaf W.B., Kinney J.N. 2010. The Carboxysome and Other Bacterial Microcompartments. Microbe, 5, 6: 257–263
- Khlebnikov A., Datsenko K.A., Skaug T., Wanner B.L., Keasling J.D. 2001. Homogeneous expression of the P_{BAD} promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. Microbiology, 147, 12: 3241–3247
- Khosla C., Kapur S., Cane D.E. 2009. Revisiting the modularity of modular polyketide synthases. Current Opinion in Chemical Biology, 13, 2: 135–143
- Kim M.-S., Stybayeva G., Lee J.Y., Revzin A., Segal D.J. 2010. A zinc finger protein array for the visual detection of specific DNA sequences for diagnostic applications. Nucleic Acids Research, 39, 5: e29
- Klug A. 2005. The Discovery od Zinc Fingers and Their Practical Applications in Gene Regulation: A Personal Account. V: Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Celullar Function. Iuchi S., Kuldell N. (eds.). New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers: 1–6
- Knight Jr T.F. 2003. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. Technical report, MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports 2003: 12 str.

http://hdl.handle.net/1721.1/21168 (1. apr. 2012)

- Kristensen C., Morant M., Olsen C.E., Ekstrøm C.K., Galbraith D.W., Møller B.L., Bak S. 2005. Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 102, 5: 1779–1784
- Kuščer E., Raspor P., Petković H. 2005. Rational Design of Polyketide Natural Products. Food Technology and Biotechnology, 43, 4: 403–410

[L]

- Lamed R., Setter E., Bayer e.A. 1983. Characterization of a Cellulose-Binding, Cellulase-Containing Complex in *Clostridium thermocellum*. Journal of Bacteriology, 156, 2: 828–836
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 21: 2947–2948

- Lebar T. Sinteza resveratrola z vezavo himernih encimov na DNK ter preverjanje učinkovitosti vezave z represijo transkripcije. 2011. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta: 96 str.
- Lee H., DeLoache W.C., Dueber J.E. 2011. Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. Metabolic Engineering, vnaprejšnja objava na spletu pred tiskom http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.003 (1. apr. 2012)
- 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. Science, 245, 4918: 635–637
- Lee P.C., Schmidt-Dannert C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 1–2: 1–11
- Libri V., Onori A., Fanciulli M., Passananti C., Corbi N. 2004. The artificial zinc finger protein 'Blues' binds the enhancer of the fibroblast growth factor 4 and represses transcription. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 2004, 560, 1–3: 75–80
- Lilley D.M.J. 1995. DNA-protein: Structural Interactions. Oxford, IRL Press: 202 str.
- Lin C., Rinker S., Wang X., Liu Y., Seeman N. C., Yan H. 2008. *In vivo* cloning of artificial DNA nanostructures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 46: 17626–17631
- 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 (PNAS), 94, 11: 5525–5530
- Lukacs G.L., Haggie P., Seksek O., Lechardeurn D., Freedman N., Verkman A.S. 2000. Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus. The Journal of Biological Chemistry. 275, 3: 1625–1629
- Luscombe N.M., Austin S.E., Berman H.M., Thornton J.M. 2000. An overview of the structures of protein-DNA complexes. Genome Biology, 1, 1: 1–37

[**M**]

- Mackay J.P., Crossley M. 1998. Zinc fingers are sticking together. Trends in Biochemical Sciences, 23, 1: 1–4
- Makrides S.C. 1996. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews, 60, 3: 512–538
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock Biology of Microorganism. 11th ed. London, Pearson Education LTD: 992 str.

- Mei Q., Wei X., Su F., Liu Y., Youngbull C., Johnson R., Lindsay S., Yan H., Meldrum D. 2011. Stability of DNA origami nanoarrays in cell lysate. Nano Letters, 11, 4: 1477–1482.
- Medema M.H., Breitling R., Takano E. 2011. Synthetic Biology in Streptomyces Bacteria.
 V: Synthetic Biology, PART A; Methods in ENZYMOLOGY, Volume 497. Voigt C. (ed.). San Diego, Academic Press: 485–502
- Michelotti N., Johnson-Buck A., Manzo A.J., Walter N.G. 2012. Beyond DNA origami: the unfolding prospects of nucleic acid nanotechnology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 4, 2: 139–152
- Miller J., McLachlan D., Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. The European Molecular Biology Organisation (EMBO) Journal, 4, 6: 1609–1614
- Mingardon F., Chanal A., López-Contreras A.M., Dray C., Bayer E.A., Fierobe H.P. 2007b. Incorporation of Fungal Cellulases in Bacterial Minicellulosomes Yields Viable, Synergistically Acting Cellulolytic Complexes. Applied and Environmental Microbiology, 73, 12: 3822–3832
- Mingardon F., Chanal A., Tardif C., Bayer E.A., Fierobe H.P. 2007a. Exploration of New Geometries in Cellulosome-Like Chimeras. Applied and Environmental Microbiology, 73, 22: 7138–7149
- Minsky M. 1957. Microscopy apparatus. United States Patent 3013467.
- Misawa N., Nakagawa M., Kobayashi K., Yamano S., Izawa Y., Nakamura K., Harashima K. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* Carotenoid Biosynthetic Pathway by Functional Analysis of Gene Products Expressed in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 172, 12: 6704–6712
- Mohr K., Kostenis E. 2011. Purinosomes under GPCR control. Nature Chemical Biology, 7: 860
- Montague M.G., Lartigue C., Vashee S. 2012. Synthetic genomics: potential and limitations. Current Opinion in Biotechnology, vnaprejšnja objava na spletu pred tiskom http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.014 (3. maj 2012)
- Mullaney J.A, Rehm, B.H.A. (2010). Design of a single-chain multi-enzyme fusion protein establishing the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway. Journal of Biotechnology, 147, 1, 31–36
- Moon T.S., Dueber J.E., Shiue E., Prather K.L.J. 2010. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. Metabolic Engineering, 12, 3: 298–305

[N]

- Nakata E., Liew F.F., Uwatoko C., Kiyonaka S., Mori Y., Katsuda Y., Endo M., Sugiyama H., Morii T. 2012. Zinc-Finger Proteins for Site-Specific Protein Positioning on DNA-Origami Structures. Angewandte Chemie International Edition, 51, 10: 2421–2124
- Nallamsetty S., Austin B.P., Penrose K.J., Waugh D.S. 2005. Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. Protein Science, 14, 12: 2964–2971
- Nallamsetty S., Waugh D.S. 2006. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. Protein Expression and Purification, 2006, 45, 1: 175–182
- Nangreave J., Han D., Liu Y., Yan H. 2010. DNA origami: a history and current perspective. Current Opinion in Chemical Biology, 14, 5: 608–615
- Nielsen K.A., Tattersall D.B., Jones P.R., Møller B.L. 2008. Metabolon formation in dhurrin biosynthesis. Phytochemistry, 69, 1: 88–98
- Nishizaki T., Tsuge K., Itaya M., Doi N., Yanagawa H. 2007. Metabolic Engineering of Carotenoid Biosynthesis in *Escherichia coli* by Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 4: 1355–1361

[O]

- Ockenga W. Photo Effects of Light. 2011. Philipps University Marburg, Institute of Cytobiology and Cytopathology, Nemčija. http://www.leica-microsystems.com/science-lab/photo-effects-of-light/ (2. maj 2012)
- Ooi A.T., Stains C.I., Ghosh I., Segal D.J. 2006. Sequence-Enabled Reassembly of β -Lactamase (SEER-LAC): A Sensitive Method for the Detection of Double-Stranded DNA. Biochemistry, 45, 11: 3620–3625
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. 1996. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. Science, 273, 5280: 1392–1395

[**P**]

- Palmer A.E., Qin Y., Park J.G., McCombs J.E. 2011. Design and application of genetically encoded biosensors. Trends in Biotechnology, 29, 3: 144–152
- Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K. 2010. Phage display: Concept, innovations, applications and future. Biotechnology Advances, 28, 6: 849–858
- Parsons J.B., Frank S., Bhella D., Liang M., Prentice M.B., Mulvihill D.P., Warren M.J. 2010. Synthesis of Empty Bacterial Microcompartments, Directed Organelle Protein Incorporation, and Evidence of Filament-Associated Organelle Movement. Molecular Cell, 38, 2: 305–315

- Pavletich N.P., Pabo C.O. 1991. Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. Science, 252, 5007: 809–817
- Pavletich N.P., Pabo C.O. 1993. Crystal Structure of a Five-Finger GLI-DNA Complex: New Perspectives on Zinc Fingers. Science, 261, 5129: 1701–1707
- Persson K., Schneider G., Jordan D.B., Viitanen P.V., Sandalova T. 1999. Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. Protein Science, 8, 11: 2355–2365
- pET System Manual. 2006. 11th Edition. Novagen: 80 str. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (5. apr. 2012)
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry, 25, 13: 1605–1612
- Pfeifer B.A., Khosla C. 2001. Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1: 106–118
- Pinheiro A.V., Han D., Shih W.M., Yan H. 2011. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. Nature Nanotechnology, 6, 12: 763–772
- Piston D.W., Kremers G.-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Trends in Biochemical Sciences, 32, 9: 407–414
- Porter J.R., Stains C.I., Jester B.W., Ghosh I. 2008. A General and Rapid Cell-Free Approach for the Interrogation Interactions and their Antagonists Utilizing Split-Protein Reporters. Journal of the American Chemical Society (JACS), 130, 2: 6488– 6497

[**Q**]

Qiao W., Mooney M., Bird A.J., Winge D.R., Eide D.J. 2006. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored *in vivo* by using FRET. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 103, 23: 8674–8679

[**R**]

- Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F., Joung J.K. 2008. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. Nature Methods, 5, 5: 374–375
- Reynolds L., Ullman C., Moore M., Isalan M., West M.J., Clapham P., Klug A., Choo Y. 2002. Repression of the HIV-1 5' LTR promoter and inhibition of HIV-1 replication by using engineered zinc-finger transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 100, 4: 1615–1620

- Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. Nature Biotechnology, 22, 4: 445–449
- Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M. 2004. HarvestPlus Technical Monograph Series 2. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Washington, DC, HarvestPlus: 58 str. http://www.ifpri.org/sites/default/files/publications/hptech02.pdf (19.4.2012)
- Rothemund P.W.K. 2006. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature. 440, 7082: 297–302
- Routzahn K.M., Waugh D.S. 2002. Differential effects of supplementary affinity tags on the solubility of MBP fusion proteins. Journal of Structural and Functional Genomics, 2, 2: 83–92

[S]

- Sabirova J.S., Haddouche R., Van Bogaert I.N., Mulaa F., Verstraete W., Timmis K.N., Schmidt-Dannert C., Nicaud J.M., Soetaert W. 2011. The 'LipoYeasts' project: using the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* in combination with specific bacterial genes for the bioconversion of lipids, fats and oils into high-value products. Microbial Biotechnology, 4, 1: 47–54
- Sambrook J., Ruseel D.W. 2006. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1st edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 800 str.
- Samoza Á. 2009. Evolution of DNA Origami. Angewandte Chemie International Edition, 48, 50: 9406–9408
- Sander J.D., Maeder M.L., Reyon D., Voytas D.F., Joung J.K., Dobbs D. 2010. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. Nucleic Acids Research, 38, Web Server issue: W462–W468 http://zifit.partners.org/ZiFiT/Introduction.aspx (28. apr. 2012)
- Sander J.D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Cade L., Zhang F., Cifuentes D., Curtin S.J., Blackburn J.S., Thibodeau-Beganny S., Qi Y., Pierick C.J., Hoffman E., Maeder M.L., Khayter C., Reyon D., Dobbs D., Langenau D.M., Stupar R.M., Giraldez A.J., Voytas D.F., Peterson R.T., Yeh J.-R.J., Joung J.K. 2011. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). Nature Methods, 8, 1: 67–69
- Savitzky A., Golay M.J.E. 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. Analytical Chemistry, 36, 8: 1627–1639
- Scaife M.A., Burja A.M., Wright P.C. 2009. Characterization of Cyanobacterial β-Carotene Ketolase and Hydroxylase Genes in *Escherichia coli*, and Their Application for Astaxanthin Biosynthesis. Biotechnology and Bioengineering, 103, 5: 944–955
- Seeman N.C. 1982. Nucleic acid junctions and lattices. Journal of Theoretical Biology, 99, 2: 237–247
- Seeman N.C. 2004. Nanotechnology and the Double Helix. Scientific American, 290, 6: 72–75
- Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., Dreier B., Effertz K., Huber A., Koksch B., Lund C.V., Magnenat L., Valente D., Barbas C.F. 2003. Evaluation of a Modular Strategy for the Construction of Novel Polydactyl Zinc Finger DNA-Binding Proteins. Biochemistry, 42, 7: 2137–2148
- Sera T. 2005. Inhibition of Virus DNA Replication by Artificial Zinc Finger Proteins. Journal of Virology, 79, 4: 2614–2619
- Seo H.S., Koo Y.J., Lim J.Y., Song J.T., Kim C.H., Kim J.K., Lee J.S., Yang D. 2000. Characterization of a Bifunctional Enzyme Fusion of Trehalose-6-Phosphate Synthetase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase of *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 66, 6: 2484–2490
- Shekhawat S.S., Ghosh I. 2011. Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions. Current Opinion in Chemical Biology, 15, 6: 789–797
- Shen W., Zhong H., Neff D., Norton M.L. 2009. NTA Directed Protein Nanopatterning on DNA Origami Nanoconstructs. Journal of the American Chemical Society (JACS), 131, 19: 6660–6661
- Shetty R.P., Endy D., Knight Jr T.F. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. Journal of Biological Engineering, 2, 5: 1–12
- Shrivastava T., Tahirov T.H. 2010. Three-Dimensional Structures of DNA-Bound Transcriptional Regulators. V: Computational Biology of Transcription Factor Binding; Methods in Molecular Biology, Volume 674. Ladunga I. (ed.). New York, Humana Press: 43–55
- Siegele D.A., Hu J.C. 1997. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 94, 15: 8168–8172
- Simmel F.C. 2012. DNA-based assembly lines and nanofactories. Current Opinion in Biotechnology, vnaprejšnja objava na spletu pred tiskom. http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.024 (1. maj 2012)
- Sørensen H.P., Mortensen K.K. 2005a. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 115, 2: 113–128

- Sørensen H.P., Mortensen K.K. 2005b. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. Microbial Cell Factories, 4, 1: 1–8
- Spurlino J.C., Lu G.Y., Quiocho F.A. 1991. The 2.3-Å resolution structure of the maltoseor maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. The Journal of Biological Chemistry, 266, 8: 5202–5219
- Srere P.A., Mosbach K. 1974. Metabolic Compartmentation: Symbiotic, Organellar, Multienzymic, and Microenvironmental. Annual Review of Microbiology, 28, 0: 61– 83
- Sri Krishna S., Majumdar I., Grishin N.V. 2003. Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY. Nucleic Acids Research, 31, 2, 532–550
- Stahl W., Sies H. 2004. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochimica et Biophysica Acta, 1740, 2: 101–107
- Stains C.I., Furman J.L., Segal D.J., Ghosh I. 2006. Site-Specific Detection of DNA Methylation Utilizing mCpG-SEER. Journal of the American Chemical Society (JACS), 128, 30: 9761–9765
- 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 the American Chemical Society (JACS), 127, 31: 10782–10783
- Stevens R.C. 2000. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. Structure, 8, 9: 177–185
- Sutter M., Boehringer D., Gutmann S., Günther S., Prangishvili D., Loessner M.J., Stetter K.O., Weber-Ban E., Ban N. 2008. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. Nature Structural Molecular Biology, 15, 9: 939–947

[T]

- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 2: 211–222
- The Cellulosome Complex (ED BAYER'S group). Weizmann Institute of Science. http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/ (26. apr. 2012)
- Thoden J.B., Holden H.M., Wesenberg G., Raushel F.M., Rayment I. 1997. Structure of Carbamoyl Phosphate Synthetase: A Journey of 96 Å from Substrate to Product. Biochemistry, 36, 21: 6305–6316
- Thoden J.B., Huang X., Kim J., Raushel F.M., Holden H.M. 2004. Long-range allosteric transitions in carbamoyl phosphate synthetase. Protein Science, 13, 9: 2398–2405

- Tsien R.Y. 2009. Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox (Nobel Lecture). Angewandte Chemie International Edition. 48, 31: 5612–5626
- Tzfira T. 2006. On tracks and locomotives: the long route of DNA to the nucleus. Trends in Microbiology, 14, 2: 61–63

[V]

- Vaughan E.E., Dean D.A. 2006. Intracellular Trafficking of Plasmids during Transfection Is Mediated by Microtubules. Molecular Therapy, 13, 2: 422–428
- Verrier F., An S., Ferrie A.M., Sun H., Kyoung M., Deng H., Fang Y., Benkovic S.J. 2011. GPCRs regulate the assembly of a multienzyme complex for purine biosynthesis. Nature Chemical Biology, 7, 12: 909–915
- Vílchez C., Forján E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I., Vega J.M. 2011. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. Marine Drugs, 9, 3: 319–333
- Visser N., Opperdoes F.R., Borst P. 1981. Subcellular Compartmentation of Glycolytic Intermediates in *Trypanosoma brucei*. European Journal of Biochemistry, 118, 3: 521– 526

[W]

- Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature, 171, 4356: 737–738
- Weeks A.M., Chang, M.C.Y. 2011. Constructing de Novo Biosynthetic Pathways for Chemical Synthesis Inside Living Cells. Biochemistry, 50, 24: 5404–5418
- Williams B.A.R., Lund K., Liu Y., Yan H., Chaput J.C. 2007. Self-Assembled Peptide Nanoarrays: An Approach to Studying Protein-Protein Interactions. Angewandte Chemie International Edition, 46, 17: 3051–3054
- Wilner O.I., Weizmann Y., Gill R., Lioubashevski O., Freeman R., Willner I. 2009. Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds. Nature Nanotechnology. 4, 4: 249–254
- Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 29: 183–212
- Wood A.J., Lo T.-W., Zeitler B., Pickle C.S., Ralston E.J., Lee A.H., Amora R., Miller J.C., Leung E., Meng X., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Meyer B.D. 2011. Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. Science, 333, 6040: 307
- Wörsdörfer B., Woycechowsky K.J., Hilvert D. 2011. Directed Evolution of a Protein Container. Science, 331, 6017: 589–592

[X]

- Xia Z., Rao J. 2009. Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer. Current Opinion in Biotechnology, 20, 1: 37–44
- Xu X., Soutto M., Xie Q., Servick S., Subramanian C., von Arnim A.G., Johnson C.H. 2007. Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 104, 24: 10264–10269

[Y]

- Ye M., Bhatia S.K. 2012. Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. Biotechnological Letters, vnaprejšnja objava na spletu pred tiskom http://dx.doi.org/10.1007/s10529-012-0921-8 (4. maj 2012)
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. 2000. Engineering the Provitamin A (β-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. Science, 287, 5451: 303–305
- Yeates T.O., Thompson M.C., Bobik T.A. 2011. The protein shells of bacterial microcompartment organelles. Current Opinion in Structural Biology, 21, 2: 223–231
- »Ylem«. *Panellus Stipticus*, Mt. Vernon, Wisconsin. 2009. Wikipedia. http://en.wikipedia.org/wiki/File:PanellusStipticusAug12_2009.jpg (2. *maj 2012*)

[**Z**]

- Zhang Y., Li S.-Z., Li J., 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 the American Chemical Society (JACS), 128,40: 13030–13031
- Zhao Z., Yan L., Yan H. 2011. Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames. Nano Letters, 11, 7: 2997–3002

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Romanu Jerali, ki mi je z možnostjo dela v Laboratoriju za biotehnologijo in sodelovanja pri dveh projektih v okviru svetovnih študentskih tekmovanj iGEM in BIOMOD odprl vrata v izjemno kreativni svet sintezne biologije, kjer želim nadaljevati svojo znanstveno kariero.

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Anderluhu in prof. dr. Nataši Poklar Ulrih za hiter, natančen in kritičen pregled diplome.

Velik hvala vsem iGEM mentorjem: Roku Gabru, dr. Moniki Avbelj, dr. Tomažu Koprivnjaku in Jerneji Mori, ki so nas, »zelene« študente, med poletjem 2010 potrpežljivo uvajali v laboratorijsko delo in nas naučili prvih korakov na poti v samostojno znanstveno raziskovanje. Hvala za ves trud in nasvete.

Zahvala gre vsem študentskim članom ekipe iGEM 2010, s katerimi smo na drugi strani Atlantika dosegli čudovit uspeh. Spomini ostajajo nepozabni. Izpostavil bi rad Tino IIc in njeno delo s karotenoidi med projektom iGEM, kar mi je olajšalo izvedbo tega dela diplome. Prav tako Tjašo Stošicki za izvedbo transfekcij plazmidov za FRET eksperimente. Zahvala gre tudi Tini Lebar za vse najine zabavne miselne preskoke med delom v laboratoriju in za navdušenje nad mojimi »dedi« frazami. Še jih bo.

Hvala dr. Mojci Benčina za njeno pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom. Z navezo »fluorescenčni proteini – konfokalc« bi se gotovo še želel kdaj srečati. Glede na to, da sem od malega povezan s športom, pa Mojci hvala tudi za organizacijo športnih dogodkov na inštitutu. Aktiven odklop od raziskovanja je dober katalizator novih idej. Skratka, kot pravi MIT-jev moto: »mens et manus«.

Zahvaljujem se sotekmovalcema v BIOMOD ekipi, Vidu Kočarju in Marku Vercetu, prav tako Robertu Bremšaku, za uvajanje v »krasni proteinski svet«.

Zahvala gre Jelki Pohar za njeno pomoč pri delu z »Orionom«.

Hvala dr. Heleni Gradišar za uvajanje v svet biofizikalne karakterizacije proteinov s pomočjo dinamičnega sipanja svetlobe in cirkularnega dikroizma.

Zahvalil bi se rad tudi Alji Oblak, ki me je seznanila z delom z računalniškim programom Chimera, s čimer sem dobil dodatno veselje do strukturne biologije.

Zahvala pa gre tudi vsem ostalim sodelavcem v Laboratoriju za biotehnologijo. Ko pomislim, sem prav od vsakega kdaj dobil tisti majhen, a dragocen nasvet za rešitev nastale zagate med laboratorijskim delom.

Hvala kolektivu Laboratorija za prehrambeno kemijo, kjer so bile izvedene HPLC analize ekstrahiranih karotenoidov, še posebej vodji laboratorija dr. Ireni Vovk in dr. Vesni Glavnik. Vesna, hvala za potrpežljivo razlago vseh malenkosti, ki sem jih hotel zvrtati v zvezi s HPLC in karotenoidi. Kot si opazila, rad pridem stvarem do dna.

Zahvaljujem se vsem sošolkam in sošolcem študija biotehnologije. Skupaj smo preživeli res luštna štiri leta.

Hvala tudi celotnemu kolektivu profesorjev študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti. Tu sem osvojil široko paleto znanj in s tem dobro izhodišče za uspešno znanstveno pot. Fakulteti lepa hvala tudi za vsa izkazana priznanja.

Zahvalil bi se rad vsem, ki so bili del moje košarkarske kariere. S košarko in športom nasploh sem dobil številne dragocene izkušnje.

Zahvaljujem se vsem domačim za spodbudne misli med nastajanjem diplomskega dela.

Gregs, tebi hvala za vse bratske pogovore o življenju, svetu in nasploh vsem. Kdo bi vedel? Morda pa nekoč iz naveze arhitekt – sintezni biolog zraste kaj zelo inovativnega.

Iskrena hvala staršem za podporo pri vseh korakih, ki sem jih v življenju naredil. Pokazala sta mi prave življenjske smernice.

PRILOGE

PRILOGA A: Oligonukleotidi za kloniranje programske DNA

Programska DNA za FRET eksperimente.

Ime oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje*			
SPR prog ZNF F	S'GTTACTACTCGAGCGATCG <mark>GAATTC</mark> GAAGGGGAATTGCTGCTGCGGTGTTTGGATGGA <mark>GCGTGGGCG</mark> GG <mark>0TGTGGAAA</mark> IT <mark>GAT</mark> GCTGCATT <mark>GACCACCCAAGACGACTGCAG</mark> TACA3'			
SPR prog ZNF R	5TGTA <mark>ETGCAG</mark> TCGTCTTGGGTGGTCAATGCAGCATCAATTTCCACACCCCGCCCACGCTCCATCCA			
* <mark>EcoRI</mark> in <mark>PstI</mark> rest Zif268, PBSII, HivO Programska DNA za	rikcijski mesti. Označena so tudi vezalna mesta za triprstne in eno petprstno domeno: in Gli1.			
Ime oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje*			
P23456 2bp F1	5 <mark>°TAGA GTTTGGATG</mark> GA <mark>GCGTGGGCG</mark> GG <mark>GTGTGGAAA</mark> TT <mark>GATGCTGCA</mark> TT <mark>GACCACCCAAGACGA</mark> GGATCC <mark>GTTTGGATG</mark> 3'			
P23456 2bp F2	5'GA <mark>GCGTGGGCG</mark> GG <mark>GTGTGGAAA</mark> TT <mark>GATGCTGCA</mark> TT <mark>GACCACCCAAGACGA</mark> ACTAGT <mark>C</mark> 3'			
P23456 2bp R1	5 <mark>TGCAGACTAGT</mark> TCGTCTTGGGTGGTCAATGCAGCATCAATTTCCACACCCCGCCCACGCTCCATCCA			
P23456 2bp R2	5'AATGCAGCATCAATTTCCACACCCCGCCCACGCTCCATCCA			
P23456 4bp F1	\$ <mark>ETAGA</mark> GTTTGGATGCGTC <mark>GCGTGGGCCG</mark> GTCC <mark>GTGTGGAAA</mark> GCGA <mark>GATGCTGCA</mark> CGGC <mark>GACCACCCAAGACGA</mark> GGATCC <mark>GTTTG</mark> GATG ³ '			
P23456 4bp F2	5'CGTC <mark>GCGTGGGCG</mark> GTCC <mark>GTGTGGAAA</mark> GCGA <mark>GATGCTGCA</mark> CGGC <mark>GACCACCCAAGACGA</mark> ACTAGTC3'			
P23456 4bp R1	5 <mark>TGCAG</mark> ACTAGTTCGTCTTGGGTGGTCGCCGTGCAGCATCTCGCTTTCCACACGGACCGCCCACGCGACGCATCCAAAC <mark>GGATCC</mark> TCGTCTTGGGTGGTC3'			
P23456 4bp R2	5'GCCGTGCAGCATCTCGCTTTCCACACGGACCGCCCACGCGACGCATCCAAAC			
P23456 8bp F1	5 <mark>°TAGA GTTTGGATG</mark> TCCAGTAC <mark>GCGTGGGCG</mark> GAACGCAG <mark>GTGTGGAAA</mark> CATGAAGC <mark>GATGCTGCA</mark> CGACACTC <mark>GACCACCCAA</mark> GACGAGGATCC <mark>GTTTGGATG</mark> 3'			
P23456 8bp F2	5TCCAGTAC <mark>GCGTGGGCG</mark> GAACGCAG <mark>GTGTGGAAA</mark> CATGAAGC <mark>GATGCTGCA</mark> CGACACTC <mark>GACCACCCAAGACGA</mark> ACTAGTC3'			
P23456 8bp R1	5 <mark>1GCAGACTAGT</mark> TCGTCTTGGGTGGTCGAGTGTCGTGCAGCATCGCTTCATGTTTCCACACCTGCGTTCCGCCCACGCGTACTGGA CATCCAAACGGATCCTCGTCTTGGGTGGTC3'			
P23456 8bp R2	5'GAGTGTCGTGCAGCATCGCTTCATGTTTCCACACCTGCGTTCCGCCCACGCGTACTGCACATCCAAAC			

* Xbal, Spel, Pstl in BamHI restrikcijska mesta. Označena so tudi vezalna mesta za triprstne in eno petprstno domeno: Blues, Zif268, PBSII, HivC in Gli1.

n	FRET _{eff, (-) kontrola} [%]	FRET _{eff, (+) kontrola} [%]	FRET _{eff, prog. DNA} [%]
1	0,90	25,57	4,24
2	1,21	25,40	7,53
3	0,81	24,57	6,02
4	1,06	23,10	4,92
5	1,52	19,63	4,24
$\overline{X_n}$	1,10	23,65	5,39
SD	0,28	2,45	1,40

PRILOGA B: Vrednosti meritev učinkovitosti FRET-a

n ... zaporedna številka meritve

 $x_n \dots$ povprečje 5-ih meritev

SD ... standardni odklon

FRET_{eff, (-) kontrola} [%] ... učinkovitost FRET-a pri negativni kontroli

 $\text{FRET}_{\text{eff},\,(+)\text{ kontrola}}$ [%] ... učinkovitost FRET-a pri pozitivni kontroli

 $\text{FRET}_{\text{eff, prog. DNA}}$ [%] ... učinkovitost FRET-a na programski DNA

PRILOGA C: Aminokislinski zaporedji fuzijskih proteinov za funkcionalizacijo DNA origamija

Z zeleno sta označeni zaporedji povezovalcev med posameznimi proteini v fuzijah.

>MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis (813 AK)

MEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSG LLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSAL MFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKG ETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAV NKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQT NSITSLYKKAERET**GSGSGS**VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGK LPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIEL KGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKTS**GGSGGGSGGS**PYKCPECGKSFSTSSDLQRH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSDHLQRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDSLQTHQRTHTGEKPYKCPECGK SFSTSSDLQRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSDHLQRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDSLQTHQRTHTG EKLEHHHHHHH

>MBP-RLuc-2C7-8xHis (897 AK)

MEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSG LLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSAL MFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKG ETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAV NKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQT NSITSLYKKAERET**GSGSGS**ASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHGN AASSYLWRHVVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIFVGHDWGACLA FHYSYEHQDKIKAIVHAESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVETMLPSKIMRKLEPEEF AAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKK FPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGKYIKSFVERVLKNEQTS**GGSGGGSGGS**LELPYACPVESCDRRFSRSDE LTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHTGEKPYACP VESCDRRFSRSDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDERKRH

λ [nm]	CD [mdeg]	λ [nm]	CD [mdeg]
200	9,6842	231	-5,3646
201	5,7984	232	-4,5813
202	2,1491	233	-3,6220
203	-1,7967	234	-3,4481
204	-3,0080	235	-2,9446
205	-8,0133	236	-2,3641
206	-8,3302	237	-2,0355
207	-9,2912	238	-1,7083
208	-10,2760	239	-1,3825
209	-10,9125	240	-1,2517
210	-11,4419	241	-1,2638
211	-11,3304	242	-0,7450
212	-10,9568	243	-0,7174
213	-10,7533	244	-0,6022
214	-10,5687	245	-0,5703
215	-11,2984	246	-0,3671
216	-10,8459	247	-0,1684
217	-10,7851	248	-0,0226
218	-11,5407	249	-0,1994
219	-10,9582	250	-0,1532
220	-11,1530	251	0,0019
221	-11,2681	252	0,0315
222	-11,4450	253	0,2812
223	-11,3953	254	0,2169
224	-10,6966	255	0,3037
225	-10,3876	256	0,3331
226	-9,4460	257	0,5801
227	-8,6581	258	0,4088
228	-8,0195	259	0,3124
229	-7,4235	260	0,5063
230	-6,4138		

PRILOGA D: Nepretvorjene povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis

PRILOGA E: Pretvorjene povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis

Spodnji niz vrednosti $10^{-3} \ge \theta_{MRE}$ v območju valovnih dolžin 200–240 nm smo uporabili za analizo sekundarne strukture fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis s programom K2d.

λ [nm]	CD [mdeg]	$10^{-3} \ge \theta_{MRE} [\deg \operatorname{cm}^2 \operatorname{dmol}^{-1}]$		
200	9,6842	3,8518		
201	10,6842	4,2495		
202	2,1491	0,8548		
203	-1,7967	-0,7146		
204	-3,0080	-1,1964		
205	-8,0133	-3,1872		
206	-8,3302	-3,3132		
207	-9,2912	-3,6955		
208	-10,2760	-4,0872		
209	-10,9125	-4,3403		
210	-11,4419	-4,5509		
211	-11,3304	-4,5065		
212	-10,9568	-4,3579		
213	-10,7533	-4,2770		
214	-10,5687	-4,2036		
215	-11,2984	-4,4938		
216	-10,8459	-4,3138		
217	-10,7851	-4,2897		
218	-11,5407	-4,5902		
219	-10,9582	-4,3585		
220	-11,1530	-4,4360		
221	-11,2681	-4,4818		
222	-11,4450	-4,5521		
223	-11,3953	-4,5324		
224	-10,6966	-4,2545		
225	-10,3876	-4,1316		
226	-9,4460	-3,7571		
227	-8,6581	-3,4437		
228	-8,0195	-3,1897		
229	-7,4235	-2,9526		
230	-6,4138	-2,5510		
231	-5,3646	-2,1337		
232	-4,5813	-1,8222		
233	-3,6220	-1,4406		
234	-3,4481	-1,3714		
235	-2,9446	-1,1712		
236	-2,3641	-0,9403		
237	-2,0355	-0,8096		
238	-1,7083	-0,6795		
239	-1,3825	-0,5499		
240	-1,2517	-0,4979		

PRILOGA F: Pretvorjenje povprečne vrednosti cirkularnega dikroizma fuzije MBPmCitrine-AZPA4-8xHis po glajenju in premiku krivulje

Spodnji niz vrednosti 10^{-3} x θ_{MRE} v celotnem območju merjenja cirkularnega dikroizma (200–260 nm) smo uporabili za izris grafa povprečne molarne eliptičnosti podane na AK ostanek fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis v odvisnosti od valovne dolžine.

λ [nm]	CD [mdeg]	$10^{-3} \mathrm{x} \theta_{MRE} [\mathrm{deg} \mathrm{cm}^2 \mathrm{dmol}^{-1}]$	λ [nm]	CD [mdeg]	$10^{-3} \mathrm{x} \theta_{MRE} [\mathrm{deg} \mathrm{cm}^2 \mathrm{dmol}^{-1}]$
200	9,2842	3,6927	231	-5,8709	-2,3351
201	5,3984	2,1472	232	-5,0801	-2,0206
202	1,4436	0,5742	233	-4,3425	-1,7272
203	-1,6897	-0,6721	234	-3,7086	-1,4751
204	-4,6630	-1,8547	235	-3,2023	-1,2737
205	-6,8592	-2,7282	236	-2,7743	-1,1035
206	-8,6873	-3,4553	237	-2,4532	-0,9757
207	-10,0331	-3,9906	238	-2,1607	-0,8594
208	-10,8917	-4,3321	239	-1,8529	-0,7370
209	-11,4657	-4,5604	240	-1,6220	-0,6451
210	-11,3758	-4,5246	241	-1,4534	-0,5781
211	-11,5818	-4,6065	242	-1,2996	-0,5169
212	-11,5738	-4,6034	243	-1,1609	-0,4617
213	-11,3956	-4,5325	244	-0,9968	-0,3965
214	-11,3322	-4,5073	245	-0,8421	-0,3349
215	-11,2802	-4,4866	246	-0,7283	-0,2897
216	-11,3245	-4,5042	247	-0,6676	-0,2655
217	-11,4106	-4,5384	248	-0,5941	-0,2363
218	-11,5077	-4,5771	249	-0,5107	-0,2031
219	-11,6418	-4,6304	250	-0,4382	-0,1743
220	-11,6698	-4,6415	251	-0,3847	-0,1530
221	-11,7799	-4,6853	252	0,3452	-0,1373
222	-11,7242	-4,6632	253	-0,2499	-0,0994
223	-11,4654	-4,5602	254	-0,1263	-0,0502
224	-11,1478	-4,4339	255	-0,0687	-0,0273
225	-10,6387	-4,2314	256	-0,0156	-0,0062
226	-10,0082	-3,9807	257	0,0245	0,0097
227	-9,2424	-3,6761	258	0,0326	0,0130
228	-8,4394	-3,3567	259	-0,0876	-0,0348
229	-7,5672	-3,0098	260	0,1063	0,0423
230	-6,6725	-2,6539			

PRILOGA G: Deleži sekundarnih struktur v PDB modelih za teoretično napoved sekundarne strukture fuzijskega proteina MBP-mCitrine-AZPA4-8xHis

Za teoretično napoved sekundarne strukture proteina smo si izbrali reprezentativne PDB modele za posamezni protein v fuziji. PDB modele smo analizirali s programom Chimera ver. 1.5.3.

Uporabljeni PDB modeli za teoretično napoved sekundarne strukture MBP-YFP-AZPA4-8xHis.

PDB koda	Opis in referenca
4MBP	maltoza vezalni protein (Spurlino in sod., 1991)
1EMA	zeleni fluorescenčni protein iz meduze Aequorea victoria (Ormo in sod., 1996)
1AAY	triprstna DiCP (Elrod-Erickson in sod., 1996)

Deleži sekundarnih struktur in število aminokislin v vsaki od njih za posamezne modele.

	4MBP	1EMA	1AAY
število AK v modelu	236	370	90
delež α-vijačnic (št. AK)	7 % (16)	47 % (174)	39 % (35)
delež β-struktur (št. AK)	45 % (107)	11 % (39)	12 % (12)
delež naključnih struktur (št. AK)	48 % (113)	42 % (157)	48% (43)

Za končno oceno smo vzeli 1-krat 4MBP, 1-krat 1EMA in 2-krat 1AAY (zaradi dejstva, da je AZPA4 domena iz 6 cinkovih prstov).

PRILOGA H: Optimizacija ekstrakcije karotenoidov

Želeli smo poiskati metodo ekstrakcije karotenoidov iz mikrobnih virov, ki bo hitra, enostavna in učinkovita. Kot glavno merilo učinkovitosti lahko npr. štejemo ekstrakcijo v enem koraku. Primerjali smo dve metodi ekstrakcije likopena, za končno merilo učinkovitosti pa smo vzeli odnos med dvema razmerjema: delež likopena po prvi ekstrakciji (*eff*₁) in delež likopena po drugi ekstrakciji (*eff*₂). Izvedli smo torej dve zaporedni ekstrakciji na istem vzorcu ter pričakovali, da bo delež likopena po drugi ekstrakciji pri eni od metod majhen, metoda pa s tem primerna za uporabo v enem koraku. V tam namen smo pomerili absorbance testnih raztopin pri absorbcijskemu maksimumu spojine (≈ 475 nm), deleže pa izračunali iz spodnjih enačb.

$$eff_1 = \frac{A_{475, reekstr}}{A_{475, ekstr} + A_{475, reekstr}}$$

$$eff_2 = \frac{A_{475,reekstr}}{A_{475,ekstr} + A_{475,reekstr}}$$

Metoda 1

(1) 3 ml bakterijske kulture dodaj 3 ml 20 % SDS

(2) vorteksiraj

(3) pusti stati 5 min

(4) dodaj 3 ml etilacetata

(5) vorteksiraj

(6) centrifugiraj 5 min pri 5000 obr/min

(7) prestavi ekstrakt v mikrocentrifugirko in ponovno ekstrahiraj

Metoda 2

(1) 3 ml bakterijske kulture centrifugiraj 5 min pri 5000 obr/min

- (2) odlij supernatant in celičnemu peletu dodaj 3 ml 20 % SDS
- (3) vorteksiraj

(4) pusti stati 5 min

(5) dodaj 3 ml etilacetata

- (6) vorteksiraj
- (7) centrifugiraj 5 min pri 5000 obr/min

(8) prestavi ekstrakt v mikrocentrifugirko in ponovno ekstrahiraj



Slika : Primerjava učinkovitosti metod ekstrakcije likopena. Z metodo 2 smo iz celic v enem koraku ekstrahirali > 90 % likopena. Na podlagi tega rezultata smo se odločili, da tudi za ekstrakcijo ostalih karotenoidov (β -karoten in zeaksantin) uporabimo metodo 2.

PRILOGA I: Umeritvene krivulje in normalizacija koncentracij karotenoidov na OD₆₀₀

Biosinteza likopena

(a) Umertivena krivulja



(b) Normalizacija na OD_{600}

št. viale	površina	γ [mg/l]	OD ₆₀₀	γ/OD ₆₀₀	povprečje	SD
1	26072	0,18	0,685	0,26		
2	31147	0,21	0,748	0,28	0,27	0,013
3	26192	0,18	0,643	0,28		
4	259882	1,77	1,609	1,10		
5	293553	2,00	1,547	1,29	1,10	0,187
6	220771	1,51	1,636	0,92		

1,2,3 - kontrolni plazmid

4,5,6 - 16 ponovitev programske DNA z 2 bp vmesnikom

Biosinteza β-karotena

(a) Umeritvena krivulja

	γ [mg/l]	površina HPLC vrha
UK 1	0,025	1909
UK 3	0,1	8650
UK 4	0,2	16082
UK 6	1	85462
UK 7	2	164841



(b) Normalizacija na OD₆₀₀

št. viale*	površina	γ [mg/l]	OD ₆₀₀	γ/OD ₆₀₀	povprečje	SD
1	51638	0,62	4,12	0,15		
2	43364	0,52	2,45	0,21	0,18	0,044
3	183030	2,20	3,57	0,62		
4	169665	2,04	3,14	0,65	0,63	0,024
5	73190	0,88	1,93	0,46		
6	94637	1,14	2,53	0,45	0,45	0,004
7	12309	0,15	1,12	0,13		
8	13466	0,16	1,23	0,13	0,13	0,001

*Poskus je bil sicer izveden v treh paralekah, a ker v primeru kultur s programsko DNA z 2 bp vmesnikom ena ni zrasla, smo rezultate prikazali le za dve paralelki.

- 1, 2 kontrolni plazmid
- 3, 4 16 ponovitev programske DNA z 2 bp vmesnikom
- 5, 6 16 ponovitev programske DNA s 4 bp vmesnikom
- 7, 8 16 ponovitev programske DNA z 8 bp vmesnikom



PRILOGA J: Pozitivna povratna zanka, ki vodi v delovanje pBAD promotorja po principu vse ali nič

Shema pozitivne povratne zanke, ki poganja pBAD promotor. V celicah E. coli DH5α arabinoza vstopi v celico skozi arabinozni transporter AraE in sproži prepisovanje kromosomalnega araE, kar vodi v še večjo količino transporterjev in posledično še več arabinoze v celici. Ker je tarčni gen pod enakim promotorjem, to končno pomeni maksimalno izražanje tarčnega gena ne glede na koncentracijo arabinoze v gojišču.

V nasprotju s to shemo pa ima sev *E. coli* BW27783 gen za arabinozni transporter pod kontrolo konstitutivnega promotorja neodvisnega od prisotnosti arabinoze. Takšna razklopitev naravnega sistema avtoindukcije pBAD promotorja po principu vse ali nič omogoča od koncentracije arabinoze odvisno inducibilno izražanje genov v posameznih celicah, kar je koristno, kadar želimo v sintetičnem biološkem sistemu nadzorovati nivo izražanja genov. Biosinteza spojin ob prisotnosti programske DNA gotovo je takšen primer, saj v povečano produkcijo spojin vodi ustrezno razmerje med encimi z DNA vezavnimi domenami in vezalnimi mesti na programski DNA.