

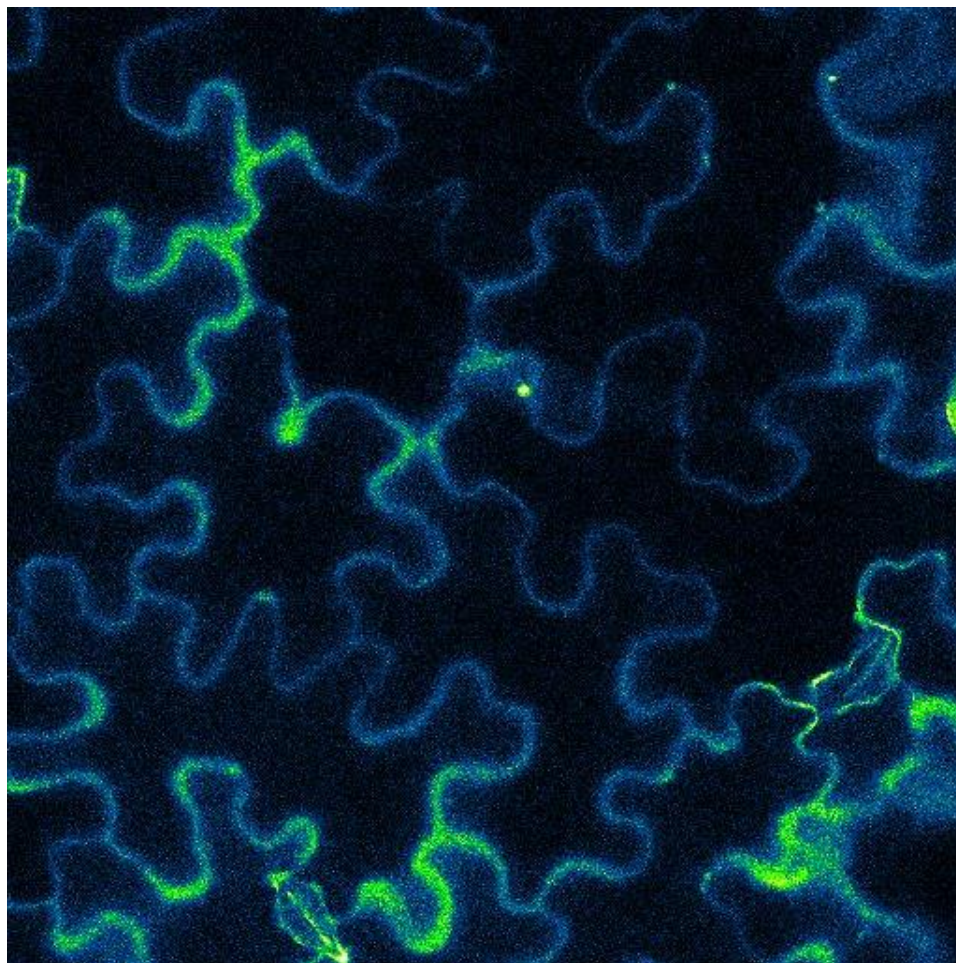


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Σχεδιασμός και κατασκευή ενός τυποποιημένου μοριακού βιοαισθητήρα FRET
για την ανίχνευση του δευτερογενούς μεταβολίτη Διοσγενίνη**

**Design and development of a standardized modular FRET biosensor for
secondary metabolite Diosgenin detection**



Πτυχιακή Εργασία

Ευάγγελος Κουρούς

Αύγουστος 2021

Τριμελής Επιτροπή

Καλλιόπη Παπαδοπούλου (επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Άννα-Μαρία Ψαρρά

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Αντώνης Γιακουντής

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής

Εξώφυλλο: Κύτταρα της κάτω επιδερμίδας (pavement cells) φύλλων *Nicotiana benthamiana* κατά την οπτικοποίηση του φαινομένου FRET σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα εκείνα τα άτομα που, με τον έναν ή τον άλλο τρόπο, συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου, η οποία με δέχτηκε στο εργαστήριο και μου επέτρεψε να ασχοληθώ με το αντικείμενο που ενδιαφέρομαι. Ήταν πάντα εκεί όταν τη χρειάστηκα, πρόθυμη να βοηθήσει, και με πίεσε με εποικοδομητικό τρόπο να δουλέψω εντατικά. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ψαρρά και τον κύριο Γιακουντή που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή επιτροπή.

Σημαντικότερος παράγοντας για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας ήταν και ο μέντορας μου, Νίκος Ντελκής. Καθημερινά με καθοδηγούσε στην ομαλή διεξαγωγή του πειράματος και είχε πάντα όρεξη να μου λύσει κάθε απορία. Είμαι πολύ χαρούμενος που είχα τη δυνατότητα να συνεργαστώ με ένα τέτοιο άτομο και οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, για κάθε λογής συμβουλή και αλληλεπίδραση.

Τέλος, είμαι ευγνώμων τόσο για την οικογένεια μου που μου έδωσε τη δυνατότητα να φτάσω ως εδώ, όσο και για τους κοντινούς μου φίλους που όλοι μαζί με βοηθούν να είμαι ο καλύτερος εαυτός μου. Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω την Παναγιώτα Φωτοπούλου που ήταν πάντα δίπλα μου στις καλές και κακές στιγμές όλη αυτήν την περίοδο.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract.....	7
Εισαγωγή	8
Ανίχνευση μεταβολιτών στα φυτά	8
Διοσγενίνη	11
Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	11
Συνθετική Βιολογία	14
Τι είναι	14
Τυποποίηση (Standardization)	15
Αποσύνδεση (Decoupling).....	16
Αφαιρετική Ιεραρχία (Abstraction)	16
Κύκλος Design-Build-Test-Learn (DBLT)	17
Συνθετική Βιολογία στα φυτά	18
Προηγμένες τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης.....	19
Ένζυμα περιορισμού Type IIS και Assembly Standards	19
Τεχνολογία GoldenBraid.....	20
Εξόρυξη κειμένου και αναζήτηση βιβλιογραφίας.....	22
Σκοπός Εργασίας.....	25
Υλικά και μέθοδοι.....	26
Εύρεση βιβλιογραφίας.....	26
Σχεδιασμός επικρατειών πρόσδεσης διοσγενίνης	26
Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων υψηλής απόδοσης.....	26
Κλωνοποίηση κατασκευών με ένζυμα type IIS.....	26
One pot dig lig.....	27
Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a	27
Απομόνωση πλασμίδιου	27
Επαλήθευση κατασκευής.....	27
Μετασηματισμός <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	28
Παροδική έκφραση σε φύλλα <i>Nicotiana benthamiana</i> <i>rdr6</i> ^{-/-}	28

Συνεστιακή μικροσκοπία και οπτικοποίηση FRET.....	28
Αποτελέσματα	30
Αναζήτηση βιβλιογραφίας και εύρεση επικρατειών πρόσδεσης διοσγενίνης.....	30
Κατασκευή πρότυπων βιοαισθητήρων διοσγενίνης με τη χρήση του FRET Acceptor	31
Έκφραση σε φυτά και μελέτη των βιοαισθητήρων διοσγενίνης	33
Συζήτηση	37
Βιβλιογραφία.....	39

Περίληψη

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαθέτουν πλήθος εφαρμογών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα, εντομοκτόνα, αρώματα, προσθετικά τροφίμων, χρωστικές και άλλα. Τα φυτά παράγουν ένα μεγάλο μέρος τους, όπου οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν βασικό ρόλο στη σηματοδότηση και σε άλλες λειτουργίες. Παρ' όλα αυτά, πολλοί μηχανισμοί δράσης τους δεν έχουν διαλευκανθεί, πράγμα που εμποδίζει την ανάπτυξη εφαρμογών τους. Οι βιοαισθητήρες με φθορίζουσες πρωτεΐνες αποτελούν λύση σε αυτό το ζήτημα καθώς παρέχουν πληροφορίες για τη συσσώρευση του επιθυμητού μεταβολίτη με υποκυτταρική ανάλυση σε πραγματικό χρόνο. Δεδομένου ότι μια εργαλειοθήκη τυποποιημένων βιοαισθητήρων για δευτερογενείς μεταβολίτες δεν υπάρχει ακόμη για τα φυτά, κατασκευάστηκε βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της διοσγενίνης. Αρχικά, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά πρωτεϊνικές επικράτειες πρόσδεσης διοσγενίνης και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ένα τυποποιημένο δέκτη Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), κατασκευασμένο προηγουμένως στο εργαστήριο, έγινε ένθεση της επικράτειας ανάμεσα σε φθορισμοφόρα. Διεξήχθη μελέτη *in vivo* με αγροεμποτισμό και εξωγενή προσθήκη προγεστερόνης σε φύλλα *Nicotiana benthamiana* για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας, εξειδίκευσης και ευαισθησίας του βιοαισθητήρα. Με τη χρήση του τυποποιημένου δέκτη, η συναρμολόγηση του βιοαισθητήρα έχει ελάχιστο χρόνο κατασκευής τριών ημερών ενώ η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι πλήρως δεκτική σε αυτοματοποίηση για ταχεία σάρωση επικρατειών. Με άλλα λόγια, η παρούσα εργασία έχει σκοπό την πειραματική απόδειξη της πλατφόρμας μας για ταχεία κατασκευή βιοαισθητήρων και ελπίζουμε πως θα οδηγήσει σε υιοθέτηση των αρχών της Συνθετικής Βιολογίας από την κοινότητα της Βιολογίας Φυτών.

Abstract

Secondary metabolites have several applications and can be used as medicine, insecticides, perfumes, food additives and more. Plants produce a vast array of them, where secondary metabolites play a key role in signaling and other functions. However, many of their mechanisms of action have not been elucidated, which hinders the development of their applications. A solution to this problem are fluorescent protein biosensors as they provide information on the accumulation of the desired metabolite with subcellular precision in real time. Since a standard biosensor toolbox for secondary metabolites does not yet exist in plants, a biosensor was developed to detect diosgenin. First, diosgenin protein binding domains were searched in the literature and then, using a standard Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) acceptor previously assembled in the lab, the domain was inserted between two fluorescent domains. An *in vivo* study was performed with agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves and addition of progesterone to determine the functionality, specificity and sensitivity of the biosensor. Thanks to the standard FRET acceptor, the construction of the biosensor has a minimum assembly time of three days while the procedure followed can be easily automated for high-throughput screening of metabolite binding domains. The present work aims at experimentally proving our platform for rapid biosensor assembly and we hope it will lead to the adoption of Synthetic Biology principles by the Plant Biology community.

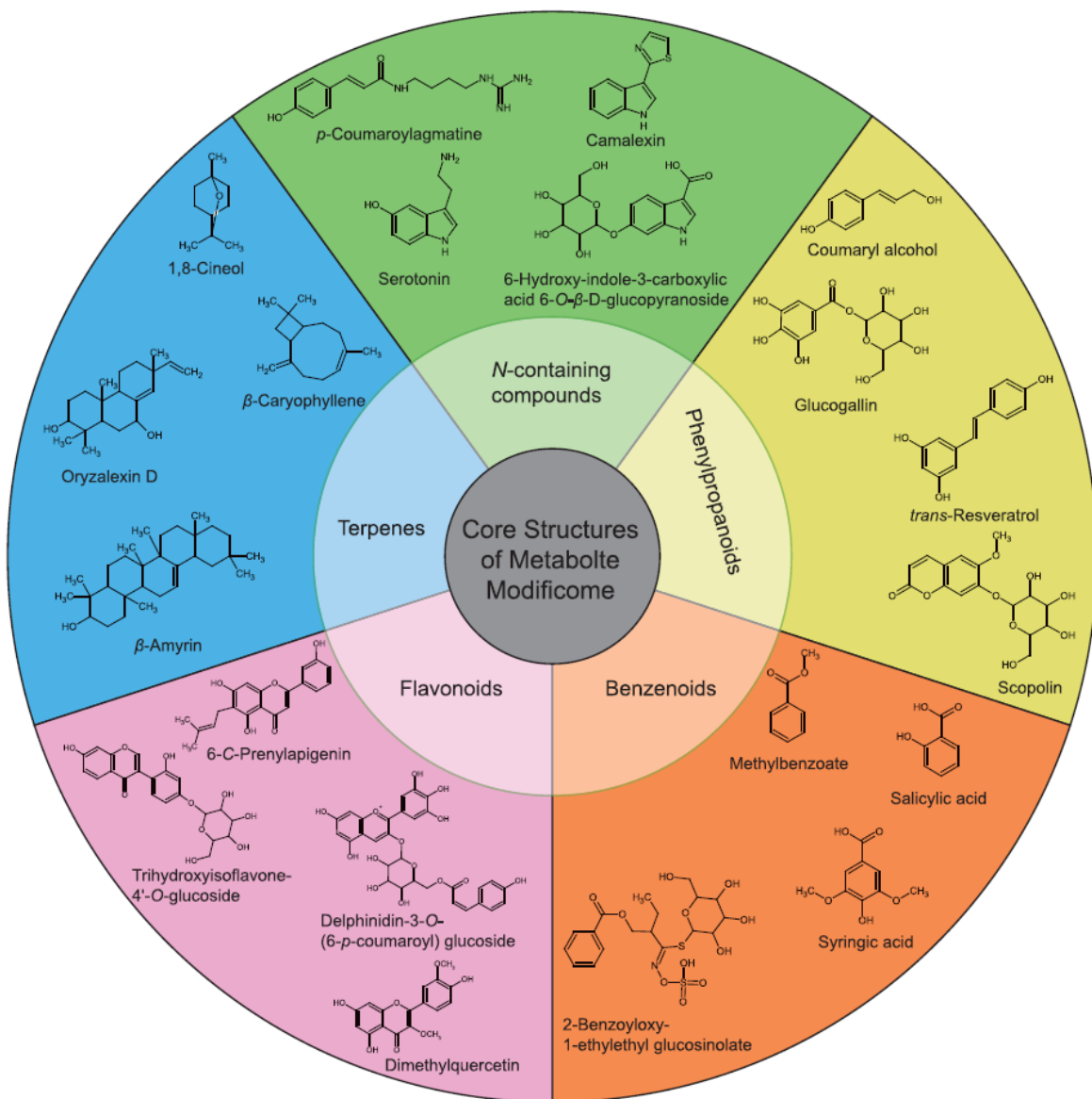
Εισαγωγή

Στις μέρες μας τείνουμε να ξεχνάμε τη σημασία των φυτών και συχνά τα θεωρούμε δεδομένα. Κι όμως, τα φυτά βρίσκονται παντού γύρω μας και είναι ζωτικής σημασίας για τη ζωή στον πλανήτη. Αποτελούν ένα σημαντικό πόρο στον οποίο βασιζόμαστε για πρώτες ύλες, φαγητό, το κλίμα [1] και τον αέρα που αναπνέουμε, καθώς και για φάρμακα μέσω του πλήθους μεταβολιτών τους [2]. Ωστόσο, δεν γνωρίζουμε τα πάντα για το μεταβολισμό τους ή τη λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο. Συνεπώς, σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κατασκευή ενός μοριακού βιοαισθητήρα για την παρατήρηση ενός τέτοιου μεταβολίτη, τη δισογενίνη. Πως όμως κατασκευάζουμε τέτοια εργαλεία οπτικοποίησης μορίων; Τι είναι η Συνθετική Βιολογία και πως επιταχύνει την όλη διαδικασία;

Ανίχνευση μεταβολιτών στα φυτά

Από την αρχή της ανθρωπότητας, η χρήση φυσικών προϊόντων με θεραπευτικές και άλλες ιδιότητες ήταν δεδομένη. Για χιλιάδες χρόνια τα φυτά ήταν μια από τις σημαντικότερες πηγές τους. Σήμερα, περίπου το 25% των φαρμάκων παγκοσμίως προέρχεται από τα φυτά, είτε απευθείας είτε έμμεσα με τη χρήση φυτικών μεταβολιτών ως πρόδρομες ενώσεις [3]. Σημαντικά παραδείγματα αποτελούν η αρτεμισίνη [4] και η πακλιταξέλη (Taxol) [5] που χρησιμοποιούνται κατά της ελονοσίας και του καρκίνου αντίστοιχα.

Τα φυτά αποτελούν σπουδαίο ρεπερτόριο τέτοιων οργανικών μορίων και μόνο ένα μικρό ποσοστό των 400.000 φυτικών ειδών έχει μελετηθεί για τη θεραπευτική τους δράση [3]. Την πλειοψηφία αυτών των μορίων απαρτίζουν μεταβολικά προϊόντα μη απαραίτητα για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή του φυτού, εξού και το όνομα δευτερογενείς μεταβολίτες [6]. Παρ' όλα αυτά, συμμετέχουν σε κρίσιμες λειτουργίες όπως η προστασία έναντι παθογόνων και οξειδωτικού στρες, οι συμβιωτικές σχέσεις με επικονιαστές και η ρύθμιση σηματοδοτικών μονοπατιών [7,8]. Υπεύθυνες για τη τεράστια ποικιλομορφία τους είναι βασικές αντιδράσεις όπως η μεθυλίωση και υδροξυλίωση ορισμένων ενώσεων [9]. Τέτοιες ενώσεις, στις οποίες χωρίζονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι τα τερπένια, αλκαλοειδή και οι φαινολικές ενώσεις (Εικόνα 1).

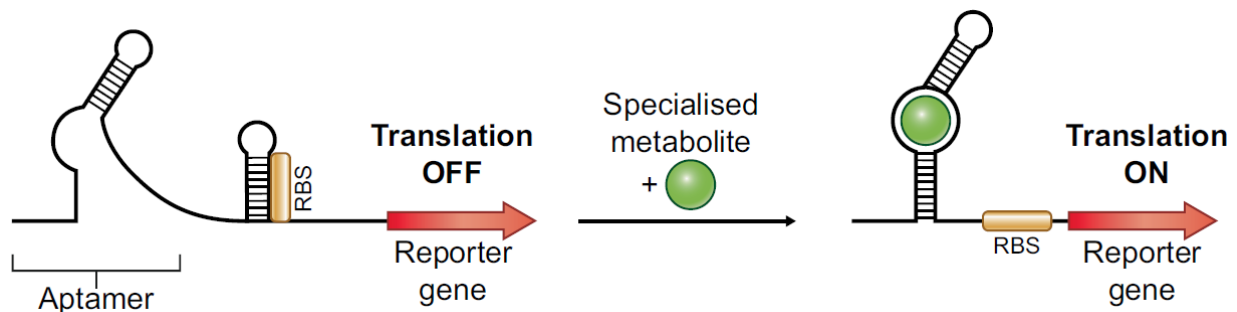


Εικόνα 1. Παραδείγματα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών ανά κατηγορία. Τα τερπένια απεικονίζονται με μπλε και τα αλκαλοειδή με πράσινο. Οι υπόλοιπες κλάσεις απαρτίζουν τις φαινολικές ενώσεις [9].

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των φυτικών μεταβολιτών στην ανάπτυξη και φυσιολογία, απαιτούνται τεχνικές άμεσης μέτρησης σε επίπεδο ιστών και κυττάρων [10]. Η συνήθης διαδικασία ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεταβολιτών περιλαμβάνει, αρχικά, την εξαγωγή τους από τους φυτικούς ιστούς. Για την εξαγωγή μπορεί να αξιοποιηθεί ένα εύρος συμβατικών και μη μεθόδων, όπως η απόσταξη, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, η χρήση υπερήχων και η ενζυμική διάσπαση [11,12]. Στη συνέχεια, για την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό των ενώσεων χρησιμοποιείται αέρια/υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας [13]. Ωστόσο, καμία από αυτές τις τεχνικές δεν παρέχει πληροφορίες για το κυτταρικό εντοπισμό των μεταβολιτών. Επίσης, η ανίχνευση μικρών

ποσοτήτων περιορίζεται κατά την ομογενοποίηση ιστών λόγω της επακόλουθης αραιώσης [13,14].

Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση μοριακών βιοαισθητήρων για την *in vivo* οπτικοποίηση της κυτταρικής συγκέντρωσης μεταβολιτών. Τέτοιοι βιοαισθητήρες έχουν κατασκευαστεί προηγουμένως για την ανίχνευση μορίων όπως ATP [15], ROS [16], Ca^{2+} [17], ακόμη και ορμονών όπως η αυξίνη [18]. Το στοιχείο προς ανίχνευση μπορεί να προσδένεται σε πρωτεϊνικές επικράτειες ή κάποια νουκλεοτιδική αλληλουχία και η οπτικοποίηση γίνεται συνήθως με φθορίζουσες πρωτεΐνες (GFP). Επιπλέον, η επαγωγή του αισθητήρα μπορεί να είναι είτε άμεση, αν το μόριο προς ανάλυση προσδένεται στον αισθητήρα, είτε έμμεση, αν απαιτούνται επιπλέον μηχανισμοί όπως ένας υποκινητής [19]. Βιοαισθητήρες βασισμένοι στο FRET ή σε απταμερή (Εικόνα 2) αποτελούν παραδείγματα, το καθένα με τα δικά του πλεονεκτήματα, όπως μέτρηση σε πραγματικό χρόνο ή χαμηλότερο μεταβολικό φορτίο αντίστοιχα [14].

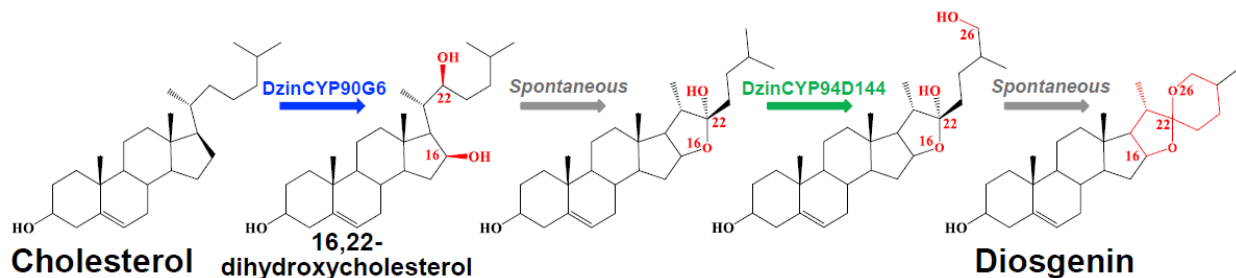


Εικόνα 2. Απεικόνιση αισθητήρα βασισμένο σε ριβοδιακόπτη. Με την πρόσδεση του μεταβολίτη στο απταμερές απελευθερώνεται η θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (RBS) επάγοντας την μετάφραση ενός γονιδίου αναφοράς [14].

Παρά τα πλεονεκτήματα και τις εφαρμογές των βιοαισθητήρων, η κατασκευή τους αποτελεί στενωπό στην έρευνα. Η εύρεση ή ο σχεδιασμός επικρατειών πρόσδεσης αποτελεί μια εντατική και χρονοβόρα διαδικασία ενώ πολλές φορές απαιτούνται περαιτέρω βήματα βελτιστοποίησης των επικρατειών [14]. Επιπλέον, εμπόδιο αποτελεί η τεράστια ποικιλία των δευτερογενών μεταβολιτών και η έλλειψη μιας πλατφόρμας τυποποιημένων μερών για την εύκολη συναρμολόγηση του αισθητήρα. Έτσι, η κατασκευή γίνεται από μεμονωμένες προσπάθειες κάθε φορά, αυξάνοντας το κόστος και το χρόνο ολοκλήρωσης ενός πειράματος.

Διοσγενίνη

Η διοσγενίνη αποτελεί μια αγλυκόνη σαπωνίνης, δηλαδή ένα φυτοστεροειδές παράγωγο χωρίς ομάδες σακχάρων [20] και βιοσυντίθεται από τη χοληστερόλη υπό τη δράση δύο ενζύμων κυτοχρώματος P450 (Εικόνα 3). Εμφανίζεται άφθονα σε φυτά του γένους *Dioscorea* και θεωρείται προϊόν συνεξέλιξης, υπεύθυνο για την άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων [21].



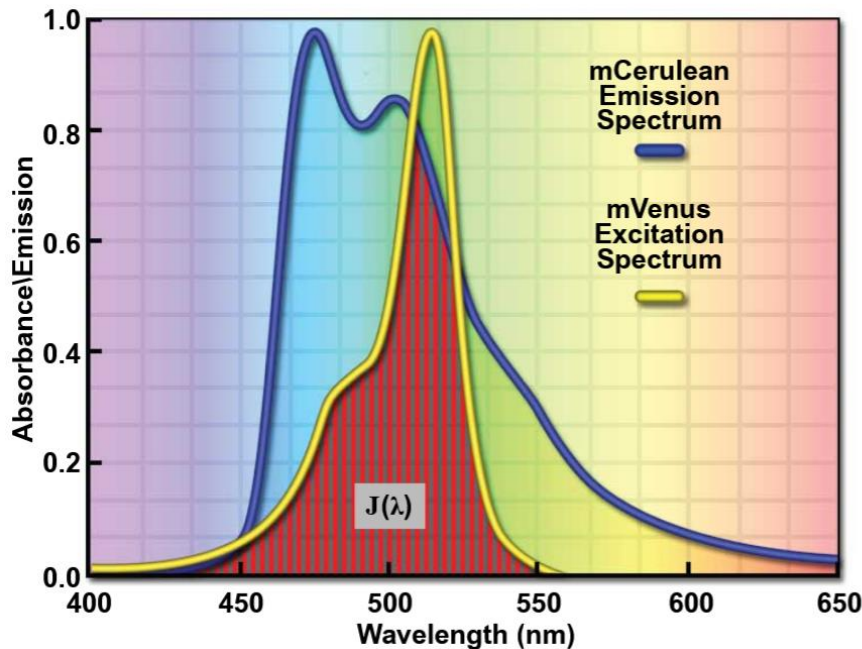
Εικόνα 3. Βιοσύνθεση της διοσγενίνης από χοληστερόλη στο φυτό *D. zingiberensis* [21].

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης μαζί με άλλες σαπωνίνες αποτελεί πρόδρομη ένωση στην προετοιμασία στεροειδών φαρμάκων όπως η προγεστερόνη και τα οιστρογόνα [22]. Επιπλέον, διαθέτει θεραπευτικές ιδιότητες και εμφανίζει προοπτικές στη θεραπεία διαταραχών όπως ο καρκίνος, λοιμώξεων, υπερχοληστερολαιμίας και φλεγμονωδών παθήσεων [23].

Λόγω της μεγάλης φαρμακολογικής της σημασίας έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες απομόνωσης και ανάλυσης, εκ των οποίων η πιο συχνή περιλαμβάνει τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένη με διάφορους ανιχνευτές [23]. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης σε κυτταρικό επίπεδο και σε πραγματικό χρόνο. Εντούτοις, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση της διοσγενίνης χρησιμοποιώντας ένα μοριακό βιοαισθητήρα βασισμένο στο FRET.

Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Ως Förster Resonance Energy Transfer (FRET) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μεταφέρεται ενέργεια, χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας, μεταξύ δύο φωτο-ευαίσθητων μορίων (φθορισμοφόρων) [24]. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει ένα φθορισμοφόρο δότη (donor) που, όταν τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, μεταφέρει την ενέργεια του στο δεύτερο φθορισμοφόρο δέκτη (acceptor). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μεταφορά ενέργειας, τα φθορισμοφόρα πρέπει να βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 10 nm, να βρίσκονται σε κατάλληλο προσανατολισμό και να υπάρχει επικάλυψη μεταξύ των δύο φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Αναπαράσταση των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης των φθορισμοφόρων mCerulean (δότης) και mVenus (δέκτης) αντίστοιχα, που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την εργασία. Για να συμβεί το FRET πρέπει να υπάρχει επικάλυψη (κόκκινες γραμμές) μεταξύ των δύο φασμάτων [36].

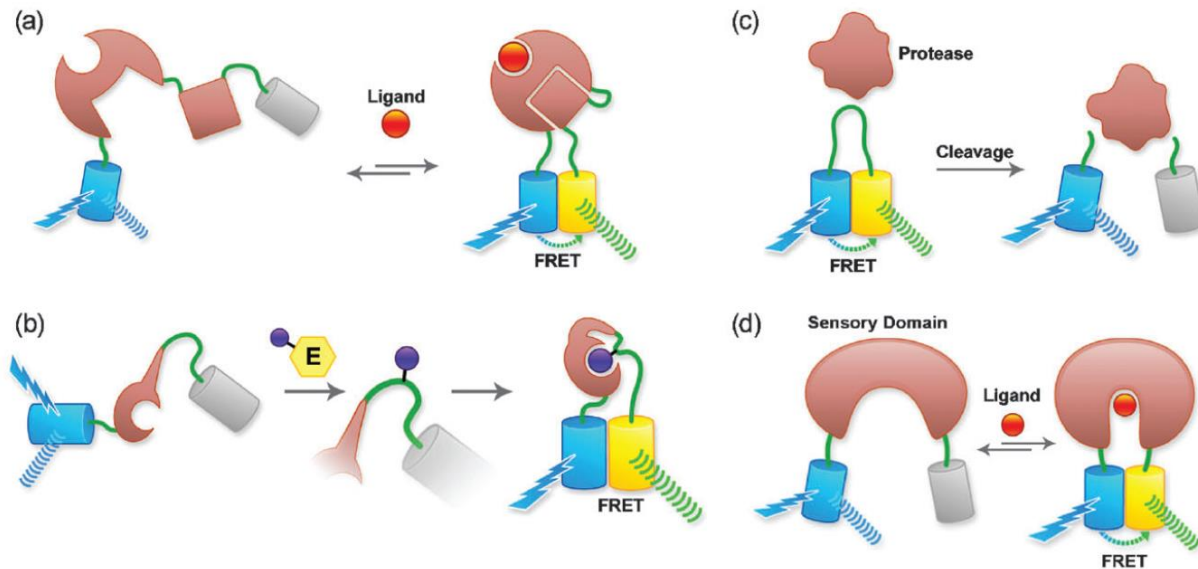
Το συγκεκριμένο φαινόμενο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και για το λόγο αυτό έχει εξελιχθεί σε μία χρήσιμη τεχνική στο χώρο της Βιολογίας. Η ποσοτικοποίηση του ξεκίνησε από το Theodor Förster και περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση [25]:

$$E = 1 / (1 + (r/R_0)^6)$$

Όπου E η απόδοση μεταφοράς ενέργειας, r η απόσταση μεταξύ των δύο φθορισμοφόρων και R_0 η απόσταση Förster, δηλαδή η απόσταση των φθορισμοφόρων όπου το FRET έχει απόδοση 50%. Η τελευταία είναι χαρακτηριστική των εκάστοτε φθορισμοφόρων και εξαρτάται από την επικάλυψη των φασμάτων εκπομπής/απορρόφησης και του προσανατολισμού τους. Η απόδοση μεταφοράς είναι η άμεση μέτρηση του κλάσματος ενέργειας που απορροφήθηκε από το δότη και τελικά μεταφέρθηκε στο δέκτη [26]. Σε αποστάσεις μεγαλύτερες των $2R_0$ δεν μεταφέρεται ενέργεια καθώς το FRET εξαρτάται από την απόσταση r στην 6^η δύναμη [25].

Στη Βιολογία, το FRET διαθέτει αμέτρητες εφαρμογές όπως η ανίχνευση διαμοριακών αλληλεπιδράσεων [27] και η δημιουργία βιοαισθητήρων. Οι βιοαισθητήρες δημιουργούνται με την τοποθέτηση μιας πρωτεϊνικής επικράτειας ανίχνευσης ανάμεσα σε ένα ζεύγος κατάλληλων φθορισμοφόρων. Διάφορες λειτουργίες εκτός της ανίχνευσης μεταβολικών παρατηρούνται στην εικόνα παρακάτω (Εικόνα 5). Η επικράτεια ανίχνευσης πρέπει να διαθέτει δύο λειτουργίες: 1) να εμφανίζει την κατάλληλη ειδικότητα για την εκάστοτε λειτουργία και 2) να ανταποκρίνεται σε αυτό με αλλαγή της διαμόρφωσης της [28]. Έτσι, θα

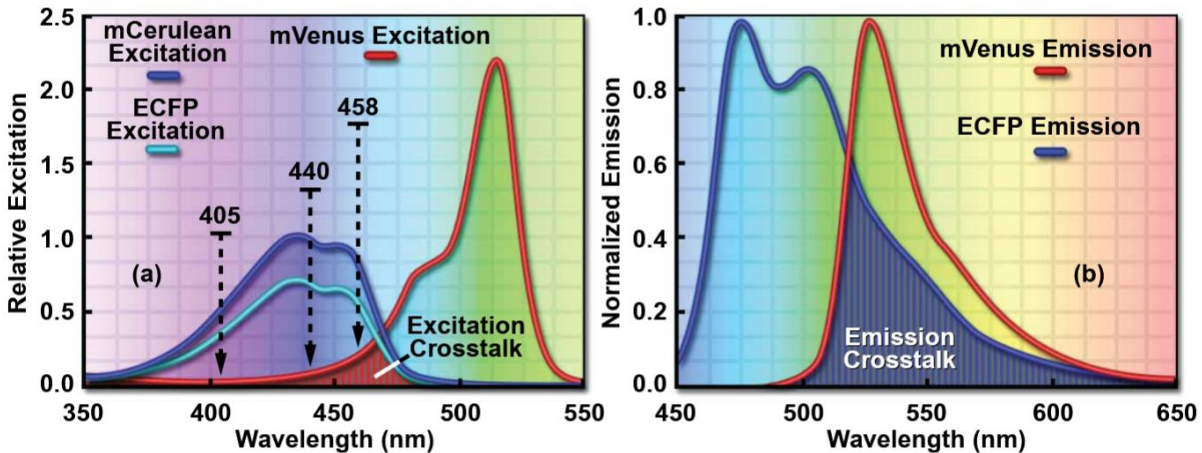
μεταβάλλεται η απόσταση μεταξύ των φθορισμοφόρων ή ο σχετικός προσανατολισμός τους επηρεάζοντας την απόδοση του FRET. Τα φθορισμοφόρα συνήθως είναι φθορίζουσες πρωτεΐνες, σαν τη GFP ή διάφορες παραλλαγές της [29], και εμφανίζουν επικάλυψη τα φάσματα εκπομπής/απορρόφησης τους.



Εικόνα 5. Βιοαισθητήρες βασισμένοι στο FRET. Ανίχνευση: πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων παρουσία μεταβολίτη (a), μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (b), υποστρώματος πρωτεάσης (c), συσσώρευσης μεταβολίτη (d) [28].

Για τη μέτρηση της απόδοσης FRET υπάρχουν διάφορες τεχνικές (π.χ. photobleaching, FLIM) [30,31], η καθεμία με τα δικά της προτερήματα. Η πιο απλή μέθοδος ονομάζεται sensitized emission και περιλαμβάνει τη διέγερση στο φάσμα απορρόφησης του δότη και τη μέτρηση στο φάσμα εκπομπής του δότη και του δέκτη [32]. Όταν υπάρχει αλλαγή στη στερεοχημική διαμόρφωση του βιοαισθητήρα, τότε αλλάζει η απόδοση FRET. Έτσι, στην περίπτωση που αυξήθηκε η απόδοση θα έχουμε αύξηση της εκπομπής του δέκτη και μείωση αυτής του δότη. Υπολογίζοντας το λόγο φάσμα-δέκτη/φάσμα-δότη, μπορούμε να συμπεράνουμε την ύπαρξη και τη συγκέντρωση του μεταβολίτη στο δείγμα υπό εξέταση [33].

Ωστόσο, ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητης επικάλυψης φασμάτων, ο δέκτης μπορεί να διεγερθεί άμεσα από το μήκος κύματος διέγερσης του δότη ή να ανιχνευτεί εκπομπή δότη στο φάσμα εκπομπής του δέκτη (Εικόνα 6). Οι δύο αυτές περιπτώσεις ονομάζονται spectral bleed-through και οδηγούν σε ψευδώς θετικό σφάλμα [26]. Έτσι, για τη σωστή διεκπεραίωση του sensitized emission απαιτούνται οι κατάλληλοι έλεγχοι και υπολογισμοί με δείγματα που εκφράζουν ξεχωριστά το δότη και το δέκτη (bleed-through controls) [34]. Μια επιπλέον λύση αποτελεί και η επιλογή κατάλληλων φθορισμοφόρων με μειωμένη επικάλυψη στα συγκεκριμένα φάσματα.



Εικόνα 6. Απεικόνιση της ανεπιθύμητης επικάλυψης μεταξύ των φασμάτων του δότη και δέκτη (spectral bleed-through). Άμεση διέγερση του δέκτη στο μήκος διέγερσης του δότη χωρίς τη διαμεσολάβηση FRET (αριστερά) και εκπομπή δότη και δέκτη σε παρόμοια μήκη κύματος (δεξιά) [36].

Τέλος, για την ποσοτικοποίηση του μεταβολίτη υπό εξέταση απαιτείται η βαθμονόμηση (calibration) του αισθητήρα και η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Αυτό επιτυγχάνεται *in vitro* με την προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων μεταβολίτη σε απομονωμένο βιοαισθητήρα και τη μέτρηση της αναλογίας FRET κάθε φορά. Με αυτά τα δεδομένα δημιουργείται πρότυπη καμπύλη η οποία χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των εκάστοτε δειγμάτων [35].

Συνθετική Βιολογία

Τι είναι

Η Συνθετική Βιολογία είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο με στόχο τη σύνθεση νέων βιολογικών συστημάτων, διαδικασιών, ακόμη και οργανισμών, συνδυάζοντας υπάρχοντα βιολογικά εργαλεία ή σχεδιάζοντας τα εκ' νέου [37]. Ένας Συνθετικός Βιολόγος δεν έχει ως σκοπό την έρευνα και την ανακάλυψη νέων βιολογικών διεργασιών αλλά την εφαρμογή τους στη λύση πλήθους προβλημάτων όπως η παραγωγή νέων φαρμάκων και η απορρύπανση. Αυτό το επιτυγχάνει εφαρμόζοντας σε ένα βιολογικό πλαίσιο τις αρχές της μηχανικής και των συστημάτων πληροφορίας και δεν λειτουργεί στοχαστικά όπως η Βιοτεχνολογία [38].

Σήμερα, οι κύριες δυσκολίες κατά το σχεδιασμό βιολογικών συστημάτων είναι (1) η μεγάλη πολυπλοκότητα τους που οδηγεί σε απρόβλεπτες και αναξιόπιστες κατασκευές και (2) η έλλειψη πλήρους εικόνας και γνώσεων [38,39]. Ωστόσο, αν και δεν συναντούν συχνά παρόμοια προβλήματα, οι μηχανικοί τα αντιμετωπίζουν με ευκολία έναντι των βιολόγων. Κι αυτό γιατί τα προσεγγίζουν μεθοδικά και εξαντλητικά, χρησιμοποιώντας τυποποιημένα εργαλεία εκμεταλλευόμενα της σύγχρονης υπολογιστικής δύναμης [39].

Η Συνθετική Βιολογία, υιοθετώντας τις βασικές αρχές της μηχανικής όπως η τυποποίηση, η αποσύνδεση και η αφαιρετική ιεραρχία, φέρνει τη Βιολογία ένα βήμα μπροστά και οδηγεί στην επιτάχυνση της πειραματικής διαδικασίας. Χάρη σε αυτήν την προσέγγιση, αλλά και τα χαμηλότερα κόστη σύνθεσης αλληλουχιών, την ευκολία γενετικής τροποποίησης και την ανάπτυξη της ρομποτικής, αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο [40].

Τυποποίηση (Standardization)

Ως τυποποίηση ορίζεται η διαδικασία εφαρμογής ή δημιουργίας προτύπων και αποτελεί σημαντική αρχή της μηχανικής. Τα πρότυπα διέπουν τις περισσότερες πτυχές του σύγχρονου κόσμου. Γνωστά παραδείγματα αποτελούν οι βίδες, οι μονάδες μέτρησης, η εφαρμογή θερινής ώρας, ακόμη και η υιοθέτηση κοινού νομίσματος από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ως στόχο έχουν τη βελτίωση του τρόπου διαβίωσης, την επιτάχυνση της εκάστοτε διαδικασίας και την εύκολη συνεργασία μεταξύ των ανθρώπων [38]. Στην ουσία αποτελούν κοινωνικές δομές, δηλαδή αντιπροσωπεύουν κανόνες και διαδικασίες οι οποίες γίνονται αποδεκτές από την κοινότητα για πρακτικούς λόγους [41]. Όσο μεγαλύτερη η αποδοχή, τόσο μεγαλύτερη και η επιτυχία του κάθε προτύπου.

Στη Βιολογία, πρότυπα έχουν ήδη θεσπιστεί από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα όπως η ονοματολογία ενζύμων, πρότυπα συναρμολόγησης (assembly standards) όπως το BioBrick [42], η χρήση των πλασμιδίων SEVA [43] ή της γλώσσας SBOL [44]. Ωστόσο, όσον αφορά την κοινότητα της βιολογικής μηχανικής, δεν έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί πρότυπα για τις περισσότερες βασικές λειτουργίες μερών όπως η ισχύς ενός υποκινητή [38]. Επιπλέον πρότυπα προς ανάπτυξη αποτελούν οι πειραματικές μετρήσεις (συγκέντρωση πρωτεϊνών, μονάδες μέτρησης φθορισμού) και παράμετροι διαδικασιών/πρωτοκόλλων (θρεπτικό υλικό, ρυθμοί ανάπτυξης) [38,45].

Για το σχεδιασμό νέων συστημάτων απαιτούνται “μέρη” (parts) τα οποία οι Συνθετικοί Βιολόγοι αναζητούν σε φυσικά συστήματα ή τα συνθέτουν μόνοι τους. Ως “μέρη” αναφέρονται αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν μια συγκεκριμένη λειτουργία. Με το χαρακτηρισμό και τη καταγραφή της λειτουργίας του κάθε μέρους, ένας μεγάλος φόρτος κόστους και χρόνου αποφεύγεται κατά την κατασκευή συστημάτων, καθώς έχει ήδη γίνει από άλλους επιστήμονες [46]. Η τυποποίηση αυτών των μερών πληροί συγκεκριμένα κριτήρια (π.χ. assembly standards) και φέρνει στο προσκήνιο δύο ακόμα βασικές μηχανικές αρχές οι οποίες επιτρέπουν τη σύνθεση πολύπλοκων συστημάτων από μέρη [37].

Η πρώτη ονομάζεται συνδυαστικότητα (modularity) και ένα σύστημα αναφέρεται ως συνδυαστικό όταν τα μέρη του μπορούν να διαχωριστούν και να επαναχρησιμοποιηθούν σε διάφορα άλλα συστήματα. Οι καινούργιοι συνδυασμοί οδηγούν σε νέες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μερών, δημιουργώντας νέα πολύπλοκα συστήματα όπου κάθε μέρος παραμένει λειτουργικά και δομικά ξεχωριστό [47]. Η δεύτερη αρχή καλείται ορθογωνικότητα και αντικατοπτρίζει την ανεξαρτησία και την έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ συνυπαρχόντων συστημάτων. Με την έλλειψη ορθογωνικότητας συνήθως αναφερόμαστε στις ανεπιθύμητες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κατασκευής/συστήματος και των φυσιολογικών λειτουργιών ενός οργανισμού, στον οποίο εισάγεται η κατασκευή [48]. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις, όπως η τοξικότητα παραγόμενων μεταβολιτών και η αλλαγή έκφρασης γονιδίων, μπορούν να αποφευχθούν με την τυποποίηση των ίδιων των οργανισμών (δημιουργία “σασί” για την εισαγωγή κατασκευών) [48,49].

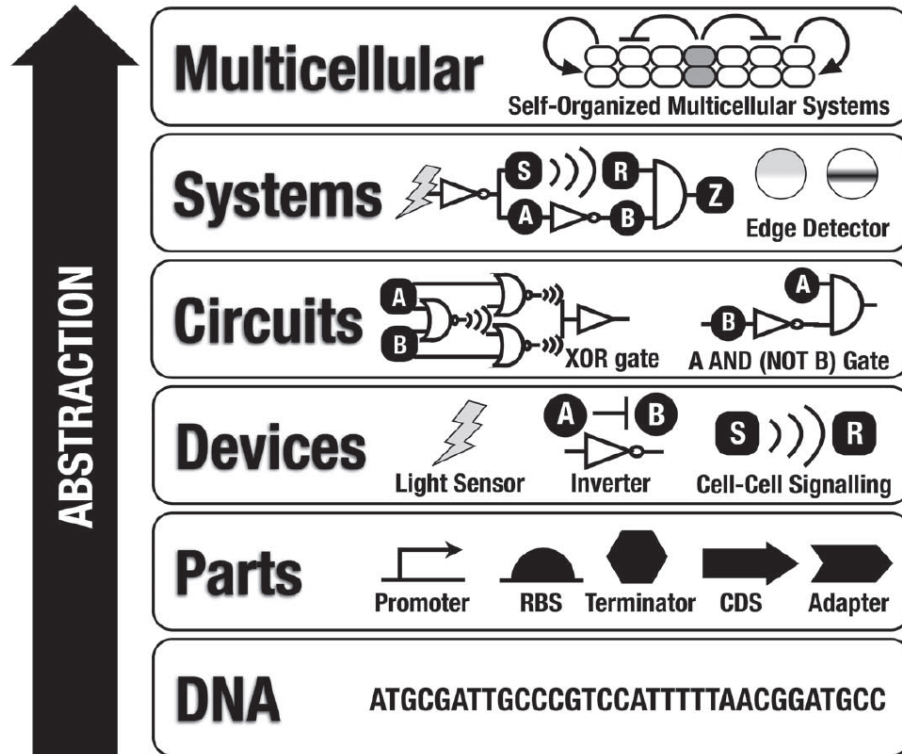
Αποσύνδεση (Decoupling)

Η αποσύνδεση είναι μια αρχή που εμφανίζει ομοιότητες με τη συνδυαστικότητα και ουσιαστικά επιτρέπει την απλοποίηση πολύπλοκων προβλημάτων, δηλαδή τον διαχωρισμό σε επιμέρους μέρη και την αντιμετώπιση τους ξεχωριστά. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα από κάθε ξεχωριστό μέρος μπορούν να συνδυαστούν στο επίπεδο του αρχικού προβλήματος. Η απλοποίηση αυτή βοηθάει στην επιτάχυνση της ερευνητικής διαδικασίας καθώς επιτρέπει ομάδες ατόμων να τα προσεγγίζουν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια [38].

Στη βιολογική μηχανική, το πιο απλό και άμεσο παράδειγμα είναι η αποσύνδεση του σχεδιασμού/μοντελοποίησης του συστήματος από την κατασκευή του [37]. Η απλοποίηση και η τυποποίηση των διαδικασιών έχει οδηγήσει στη δημιουργία πλήρως αυτοματοποιημένων βιο-χυτηρίων (biofoundries), αντίστοιχα της βιομηχανίας. Τα συγκεκριμένα εργαστήρια διαθέτουν ένα εύρος τυπικού εξοπλισμού, όπως θερμοκυκλοποιητές και επωαστήρες, χειριζόμενου από ρομποτικούς βραχίονες που μεταφέρουν τα δείγματα μεταξύ των οργάνων. Η ελαχιστοποίηση της ανθρώπινης παρέμβασης μειώνει τα σφάλματα και επιταχύνει την κατασκευή γενετικών συστημάτων ή συνθετικών γονιδιωμάτων κατά παραγγελία. Παραδείγματα βιο-χυτηρίων αποτελούν το Concordia Genome Foundry και το London DNA Foundry που εστιάζουν στην αλληλούχηση νέας γενιάς και τη συναρμολόγηση πολύπλοκων συστημάτων αντίστοιχα [50,51].

Αφαιρετική Ιεραρχία (Abstraction)

Η αφαιρετική ιεραρχία είναι μια χρήσιμη έννοια για τη διαχείριση πολύπλοκων συστημάτων στη Συνθετική Βιολογία και επιτρέπει το διαχωρισμό των πληροφοριών ενός συστήματος σε επίπεδα ανάλογα με την πολυπλοκότητα τους. Στη συνέχεια, οι ερευνητές μπορούν να εργαστούν σε ένα από αυτά τα επίπεδα χωρίς να δίνουν σημασία σε άλλα επίπεδα, δηλαδή αποκρύπτονται οι περιττές πληροφορίες [38]. Η ιδέα αυτή είναι ενσωματωμένη στη Συνθετική Βιολογία καθώς στόχος της είναι η κατασκευή συστημάτων τα οποία χωρίζονται σε επιμέρους επίπεδα, τις συσκευές και τα μέρη. Παράδειγμα αυτού του διαχωρισμού φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 7. Παράδειγμα αφαιρετικής ιεραρχίας από αλληλουχίες DNA σε πολυκύτταρα συστήματα όπως αυτή εφαρμόζεται στη Συνθετική Βιολογία [52].

Κύκλος Design-Build-Test-Learn (DBLT)

Ο κύκλος DBLT αποτελεί θεμέλιο λίθο όλων των τωρινών προσεγγίσεων της Συνθετικής Βιολογίας γύρω από τον οποίο πλαισιώνονται όλες οι παραπάνω αρχές. Ουσιαστικά είναι μια κυκλική ροή εργασίας αποτελούμενη από τέσσερα βασικά στάδια και προσφέρει τη δυνατότητα μάθησης μετά από κάθε επανάληψη του [37,53]. Τα βασικά στάδια είναι τα εξής:

1. Σχεδιασμός/μοντελοποίηση του συστήματος (Design). Εδώ προσδιορίζεται ο στόχος του πειράματος και σχεδιάζονται τα απαραίτητα μέρη, συνήθως με τη βοήθεια υπολογιστή (Computer-aided design).
2. Κατασκευή του συστήματος με βάση το σχέδιο/μοντέλο (Build). Τα απαραίτητα μέρη συντίθενται, συναρμολογούνται και το σύστημα που προκύπτει μεταφέρεται στον οργανισμό.
3. Δοκιμή του συστήματος και σύγκριση με το αρχικό σχέδιο (Test). Περιλαμβάνονται όλες οι μέθοδοι διαλογής και βιοχημικές αναλύσεις προκειμένου το σύστημα να αξιολογηθεί.
4. Συλλογή και επεξεργασία των πληροφοριών με σκοπό τον επανασχεδιασμό του αρχικού συστήματος (Learn).

Όλα τα παραπάνω στάδια μπορούν να αυτοματοποιηθούν μέσω των αρχών της μηχανικής και χάρη στην επαναληπτική φύση του κύκλου DBLT. Ακόμη, η μείωση του κόστους σύνθεσης αλληλουχιών και η ανάπτυξη τεχνολογιών δοκιμής υψηλής απόδοσης μπορεί να βελτιστοποιήσει τον κύκλο. Χιλιάδες παραλλαγές ενός αρχικού συστήματος μπορούν να συντίθενται και να αξιολογούνται μέσω μηχανικής μάθησης (Synthesis-aided design) [54]. Γνωστό παράδειγμα χρήσης του κύκλου DBLT είναι η δημιουργία συνθετικών κυττάρων με το μικρότερο γνωστό γονιδίωμα [55].

Συνθετική Βιολογία στα φυτά

Η Συνθετική Βιολογία ξεκίνησε με την κατασκευή γενετικών κυκλωμάτων και συσκευών σε βακτηριακά συστήματα και οι πρόοδοι της μεταφράστηκαν αρχικά σε λύσεις βιοϊατρικών και βιομηχανικών προβλημάτων [56]. Με τη μεταφορά της στη ζύμη και σε κύτταρα θηλαστικών σχεδιάστηκαν γενετικοί διακόπτες και κύτταρα με αξιόπιστες θεραπευτικές ιδιότητες [57]. Αντίστοιχα, στα φυτά γίνονται ήδη μεγάλα βήματα στην εφαρμογή αρχών και μεθοδολογιών της Συνθετικής Βιολογίας για την δημιουργία συνθετικών εκκινήτων, γονιδίων και μονοπατιών. Με την πάροδο του χρόνου, η Συνθετική Βιολογία φυτών διαδραματίζει ολοένα και πιο σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση ανοχής σε συνθήκες καταπόνησης και στην αύξηση παραγωγής τροφίμων, βιοκαυσίμων, μεταβολιτών και φαρμάκων [53]. Ωστόσο, αυτή η πρόοδος γίνεται με αργούς ρυθμούς λόγω της έλλειψης καλά χαρακτηρισμένων και τυποποιημένων μερών και συσκευών. Επιπλέον, τα φυτά διαθέτουν πολύπλοκα, συνήθως και πολυπλοειδή, γονιδιώματα με πολλά γονίδια άγνωστης λειτουργίας και σύνθετους τρόπους ρύθμισης. Έτσι, επειδή δεν έχουμε πλήρη εικόνα του φυτού προς τροποποίηση, τα μέρη και τα συστήματα που κατασκευάζονται συνήθως δεν είναι αξιόπιστα (έλλειψη ορθογωνικότητας) [37]. Για την επιτάχυνση της Συνθετικής Βιολογίας στα φυτά πρέπει να γνωρίζουμε σε βάθος το σύστημα προς τροποποίηση, εξού και η σημασία της κατασκευής μοριακών βιοαισθητήρων στην διαλεύκανση μονοπατιών και ρύθμισης των φυτών.

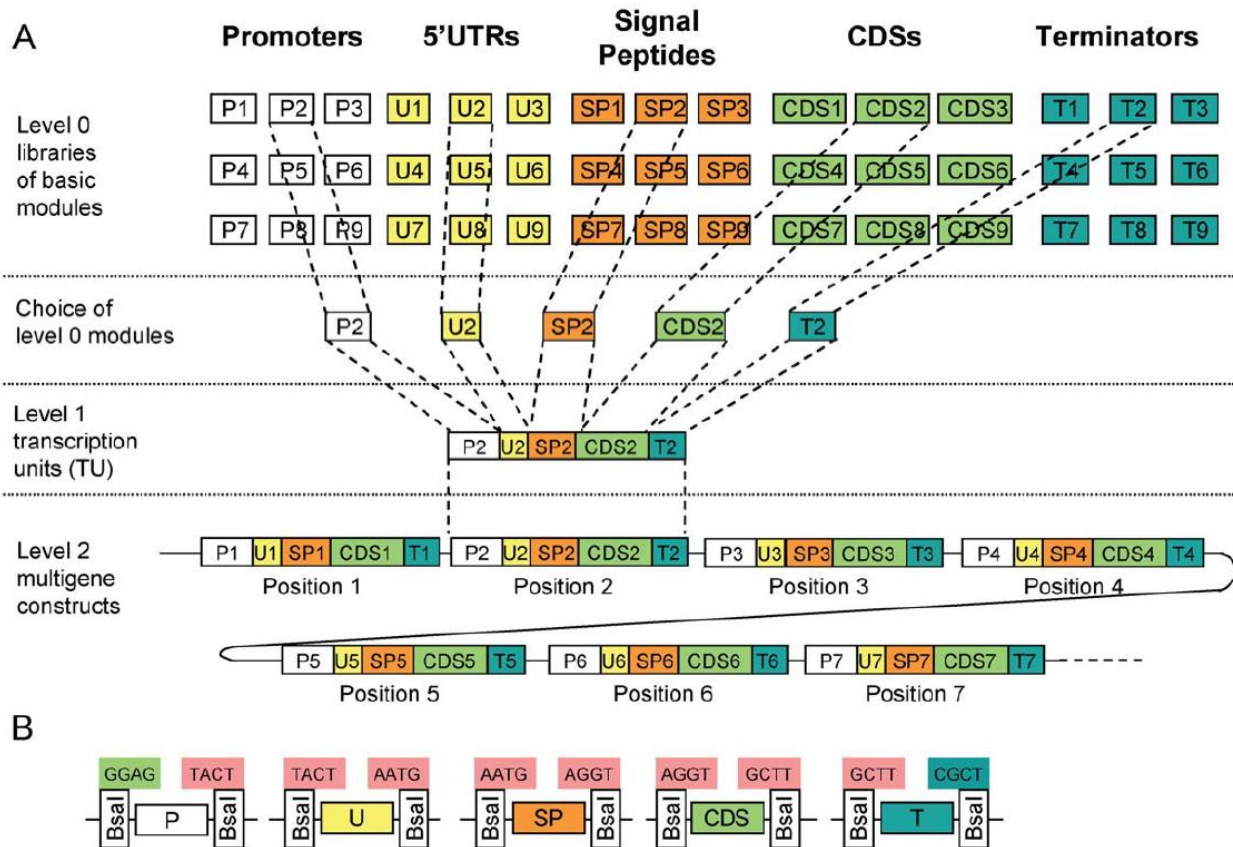
Προηγμένες τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης

Τα τελευταία 25 χρόνια, η ανάγκη για αποδοτικά συστήματα συναρμολόγησης μερών DNA οδήγησε στην ανάπτυξη προηγμένων τεχνικών μοριακής κλωνοποίησης. Αυτές περιλαμβάνουν μεθόδους βασισμένες στη χρήση περιοριστικών ενζύμων ή της PCR για την ενσωμάτωση, τεχνολογίες που χρησιμοποιούν τοπο-ειδικό ανασυνδυασμό (Gateway Cloning), καθώς και τεχνολογίες ένωσης επικαλυπτόμενων τμημάτων (Gibson Assembly) [58,59]. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η προσέγγιση των ενζύμων περιορισμού Type IIS που εμφανίζει μεγάλη ευελιξία και βρίσκει εφαρμογή στη συναρμολόγηση πολύπλοκων DNA κατασκευών στη Συνθετική Βιολογία [58]. Βασισμένες στα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν αναπτυχθεί δύο ξεχωριστές τεχνολογίες, το Golden Gate και GoldenBraid, που αναλύονται παρακάτω.

Ένζυμα περιορισμού Type IIS και Assembly Standards

Η κύρια διαφορά των ενζύμων περιορισμού Type IIS έναντι άλλων είναι η κοπή του DNA εκτός της θέσης αναγνώρισης της αλληλουχίας. Συγκεκριμένα, αναγνωρίζουν μη παλίνδρομες αλληλουχίες και, σε απόσταση μιας βάσης, δημιουργούν κολλώδη άκρα τεσσάρων βάσεων ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους. Έτσι, μπορούμε να ενώσουμε πολλά μέρη DNA με συγκεκριμένη σειρά, σε αντίδραση ενός βήματος (one-pot dig-lig) [60]. Επιπλέον, τα ενωμένα μέρη δεν φέρουν τις αλληλουχίες αναγνώρισης και δεν μπορούν να κοπούν ξανά με το ίδιο ένζυμο, πράγμα που επιτρέπει την ένωση κωδικοποιητικών αλληλουχιών χωρίς την ένθεση μη επιθυμητών αμινοξέων [58,60].

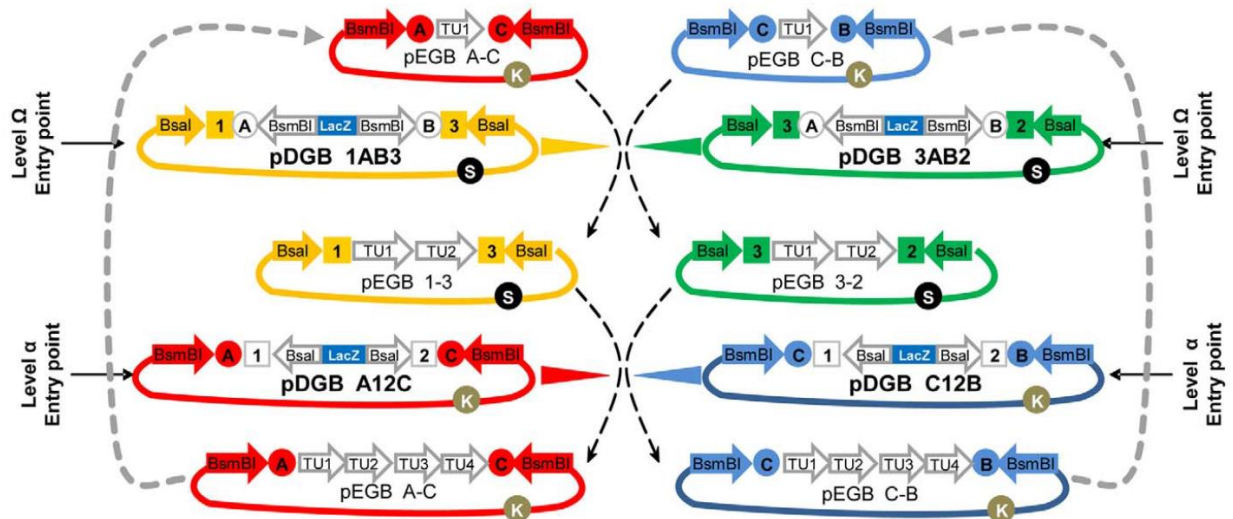
Ακολουθώντας τις αρχές της μηχανικής, με σκοπό τη μοναδική σειρά ένθεσης των μερών DNA και την εύκολη ανταλλαγή χαρακτηρισμένων τμημάτων μεταξύ επιστημόνων, έχει δημιουργηθεί ένα πρότυπο συναρμολόγησης μέσω περιοριστικών ενζύμων Type IIS. Το συγκεκριμένο πρότυπο (assembly standard) προσδιορίζει ένα “γενετικό συντακτικό” όπου τα μέρη DNA, ανάλογα με τη λειτουργία τους (π.χ. υποκινητής, τερματιστής), θα διαθέτουν πάντα συγκεκριμένες ετικέτες τεσσάρων βάσεων σε κάθε άκρο [61,62]. Αυτή η τυποποίηση των άκρων έχει υιοθετηθεί από τις κοινότητες της Συνθετικής Βιολογίας και της Βιολογίας Φυτών με αποτέλεσμα την εναλλαγή μερών μεταξύ Golden Gate (MoClo) (Εικόνα 8.B) [63] και GoldenBraid (GB2.0) [64].



Εικόνα 8. Απεικόνιση της ιεραρχίας της τεχνολογίας Golden Gate MoClo. Το επίπεδο 0 (Level 0, L0) αποτελείται από χαρακτηρισμένα μέρη με συγκεκριμένες λειτουργίες (π.χ. κωδική αλληλουχία). Στο επίπεδο 1 παρατηρείται η κατασκευή μιας μεταγραφικής μονάδας (TU) από τα L0 μέρη και στο επίπεδο 2 η συγκρότηση πολλών Tus (A). L0 μέρη με ετικέτες τεσσάρων νουκλεοτιδίων, “γενετικό συντακτικό” (B) [65].

Τεχνολογία GoldenBraid

Το GoldenBraid (GB) είναι ένα σύστημα συναρμολόγησης τμημάτων DNA, το οποίο σχεδιάστηκε για τη Συνθετική Βιολογία στα φυτά και τη Μεταβολική Μηχανική. Ο τρόπος που χρησιμοποιεί τα ένζυμα περιορισμού type IIS για τη συναρμολόγηση πολύπλοκων DNA κατασκευών από βιβλιοθήκες χαρακτηρισμένων μερών είναι παρόμοιος με το Golden Gate assembly. Ωστόσο, οι δύο αυτές τεχνολογίες εμφανίζουν διαφορές. Αρχικά, το Golden Gate χρησιμοποιεί τα ένζυμα BsaI και BpiI, ενώ το GoldenBraid τα BsaI και BsmBI [60,66]. Η κύρια διαφορά έγκειται στην ιεραρχία συναρμολόγησης, όπου το GoldenBraid φέρνει το Golden Gate ένα βήμα μπροστά χρησιμοποιώντας ένα επαναληπτικό βρόχο “πλεξούδα” (Εικόνα 9).



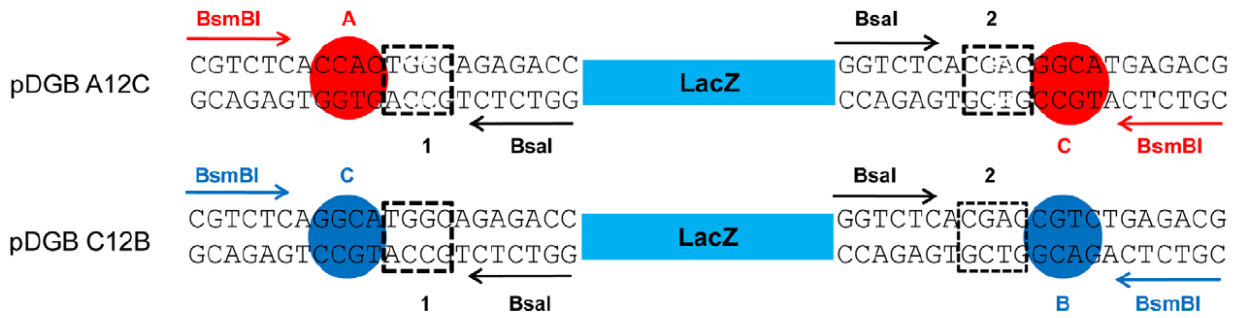
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνολογίας GoldenBraid. Η εναλλαγή μεταξύ Level α και Ω φορέων (“πλεξούδα”) επιτρέπει την ασταμάτητη συναρμολόγηση πολύπλοκων κατασκευών [66].

Σε αντίθεση με το Golden Gate που χρησιμοποιεί μια ιεραρχία τριών επιπέδων (Εικόνα 8.A), το GoldenBraid βασίζεται στην επαναληπτική διάταξη δύο επιπέδων, η οποία ακολουθεί τα εξής βήματα:

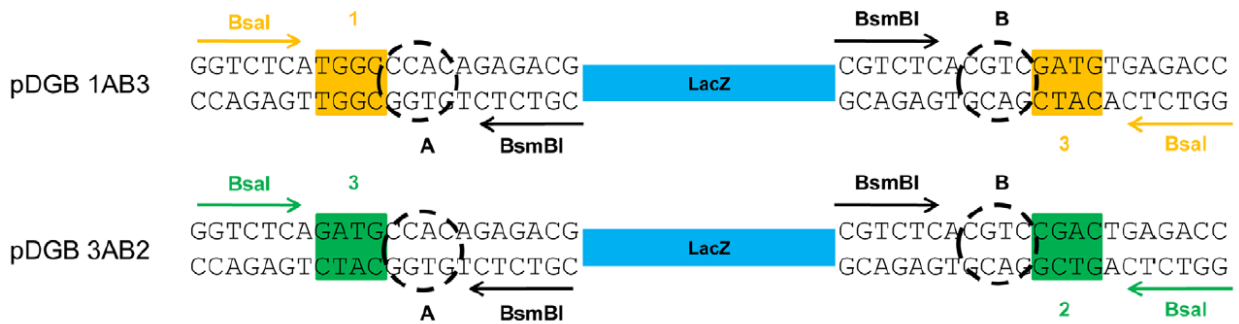
1. Στις επιθυμητές αλληλουχίες DNA προστίθενται τα κατάλληλα άκρα με overhang PCR και εισάγονται με πέψη BsmBI σε universal domesticator φορέα (pUPD), δημιουργώντας ένα GB part (L0 επίπεδο αντίστοιχα του Golden Gate). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για άλλα μέρη.
2. Έπειτα, τα GB parts ενώνονται μεταξύ τους σε ένα Level α φορέα με πέψη BsaI. Η κατασκευή που δημιουργείται αντιστοιχεί στο επίπεδο L1 (ένα transcriptional unit).
3. Δύο Level α φορείς οδηγούν στη συναρμολόγηση ενός Level Ω φορέα (L2, δύο transcriptional units) με πέψη BsmBI. Οι Level Ω φορείς μπορούν και αυτοί να συνδυαστούν σε ένα Level α φορέα με πέψη BsaI [66].

Στο τελευταίο βήμα, η εναλλαγή μεταξύ των φορέων (“πλεξούδα”) μπορεί να γίνεται ασταμάτητα, σε αντίθεση με το Golden Gate, χάρη στη διάταξη των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων στους φορείς (Εικόνα 10).

LEVEL α PLASMIDS



LEVEL Ω PLASMIDS



Εικόνα 10. Αναπαράσταση των Type IIS θέσεων περιορισμού των φορέων Level α και Ω . Οι θέσεις κοπής Bsal επισημαίνονται με τετράγωνο ενώ με κύκλο οι θέσεις κοπής BsmBI [66].

Εξόρυξη κειμένου και αναζήτηση βιβλιογραφίας

Ως εξόρυξη κειμένου (text mining) ορίζεται η εφαρμογή αλγορίθμων και μεθόδων, από πεδία της μηχανικής μάθησης και της στατιστικής, σε κείμενα με σκοπό την εύρεση νέων χρήσιμων μοτίβων. Η εξόρυξη κειμένου είναι μια παραλλαγή της εξόρυξης δεδομένων (data mining) και η διαφορά τους εντοπίζεται στο ότι η εξαγωγή πληροφοριών γίνεται από κείμενα φυσικής γλώσσας και όχι από μεγάλες βάσεις δεδομένων [67]. Οι συγκεκριμένες τεχνολογίες εμφανίζουν πλήθος εφαρμογών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της εξόρυξης δεδομένων είναι η χρήση του ιστορικού συναλλαγών πελατών για την αυτόματη αναγνώριση απάτης ή την τοποθέτηση προϊόντων κοντά στα ράφια ενός μάρκετ (π.χ. φακός-μπαταρία) [68].

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν προγράμματα που να διαβάζουν κείμενα φυσικής γλώσσας όπως ένας ανθρώπινος εγκέφαλος. Ωστόσο, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην πραγματοποίηση δευτερευόντων εργασιών στην ανάλυση κειμένου. Ένα πολύ ενεργό και πολλά υποσχόμενο πεδίο εφαρμογής αποτελούν οι βιοεπιστήμες όπου η εξόρυξη κειμένου χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό φράσεων/λέξεων που συνυπάρχουν σε άρθρα με σκοπό την πρόβλεψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων [69] ή αιτιών ασθενειών [70]. Μια άλλη

εφαρμογή είναι η εύρεση σχετικής βιβλιογραφίας στα πλαίσια ενός άρθρου ανασκόπησης ή μιας βιολογικής ερώτησης όπως ο εντοπισμός επικρατειών πρόσδεσης διοςγενίνης [72].

Οι δύο κύριοι τρόποι αυτοματοποίησης της αναζήτησης βιβλιογραφίας είναι μέσω δικτύων παραπομπών (citation networks) και της εξόρυξης κειμένου [72]. Και στις δύο μεθοδολογίες χρησιμοποιείται ένα σύνολο προκαθορισμένων άρθρων που κρίνει ο ερευνητής σχετικό με το αντίστοιχο θέμα, εισάγοντας όμως μια προκατάληψη επιλογής βάσει των γνώσεων του ερευνητή. Με βάση αυτά τα άρθρα, τα δίκτυα παραπομπών μπορούν να εντοπίσουν κοινή/σχετική βιβλιογραφία που, όμως, περιορίζεται στον αριθμό ανακτημένων άρθρων. Αντίθετα, η εξόρυξη κειμένου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση λέξεων-κλειδιών (keywords), δηλαδή ακολουθίες μιας ή περισσότερων λέξεων που συνοψίζουν το περιεχόμενο του εκάστοτε κειμένου. Στη συνέχεια, οι λέξεις-κλειδιά μαζί με άλλες του ερευνητή συνδυάζονται σε ένα “search string” και αναζητούνται παρόμοια άρθρα σε βάσεις δεδομένων όπως η PubMed [71], αυξάνοντας τον αριθμό ανακτημένων άρθρων.

Για την αυτόματη εξαγωγή λέξεων-κλειδιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα εύρος τεχνικών, από απλές στατιστικές προσεγγίσεις μέχρι και προσεγγίσεις μηχανικής μάθησης. Μια χρήσιμη στατιστική μέθοδος αποτελεί ο Rapid Automatic Keyword Extraction (RAKE) αλγόριθμος που στηρίζεται στην παρατήρηση ότι οι λέξεις-κλειδιά συνήθως είναι ακολουθίες λέξεων αδιάκοπες από σημεία στίξης ή άλλες κοινές λέξεις (π.χ. στο, και, εκεί, μαζί) [72]. Τα βασικά βήματα του αλγόριθμου RAKE είναι τα εξής:

1. Με βάση το κείμενο δημιουργούνται δύο πίνακες. Ο πρώτος αποτελείται από όλες τις λέξεις που απαρτίζουν το κείμενο ενώ ο δεύτερος αποτελείται από αδιάκοπες ακολουθίες λέξεων. Κάθε ακολουθία λέξεων του δεύτερου πίνακα αποτελεί μια υποψήφια λέξη/ακολουθία-κλειδί.

Για παράδειγμα, η πρόταση “Οι φοιτητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας” θα χωριστεί σε [“Οι”, “φοιτητές”, “του”, “Πανεπιστημίου”, “Θεσσαλίας”] και [“φοιτητές”, “Πανεπιστημίου Θεσσαλίας”].

2. Οι λέξεις που απαρτίζουν κάθε υποψήφια λέξη-κλειδί (αδιάκοπη ακολουθία) βαθμολογούνται με βάση τους δύο πίνακες. Συγκεκριμένα, βάσει του πρώτου πίνακα υπολογίζεται η εκάστοτε συχνότητα (frequency) ενώ βάσει του δεύτερου πίνακα υπολογίζεται ο βαθμός συνύπαρξης (degree) με άλλες λέξεις των αδιάκοπων ακολουθιών (λέξη-κλειδί). Η τελική βαθμολογία προκύπτει από το βαθμό προς τη συχνότητα (degree/frequency).

Στο παράδειγμα, κάθε λέξη εμφανίζεται μια φορά (frequency=1). Ωστόσο, οι βαθμοί διαφέρουν: “φοιτητές”=1, “Πανεπιστημίου”=2, “Θεσσαλίας”=2. Η τελική βαθμολογία συμπίπτει με τους βαθμούς αφού η συχνότητα είναι ένα.

3. Η βαθμολογία κάθε υποψήφιας λέξης-κλειδί υπολογίζεται μετά από πρόσθεση των βαθμολογιών των λέξεων που τις απαρτίζουν.

Έτσι, η λέξη-κλειδί “φοιτητές” βαθμολογείται τελικά με ένα ενώ η λέξη-κλειδί “Πανεπιστημίου Θεσσαλίας” με τέσσερα.

4. Τέλος, με βάση τις προτιμήσεις του ερευνητή και τις εκάστοτε συνθήκες, καθορίζεται ένα κατώφλι με το οποίο επιλέγονται οι λέξεις-κλειδιά, είτε μέγιστο αριθμό λέξεων είτε ελάχιστη βαθμολογία.

Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός τυποποιημένου και συνδυαστικού μοριακού βιοαισθητήρα FRET για την ανίχνευση του δευτερογενούς μεταβολίτη διοσγενίνη. Με τη χρήση βασικών αρχών της Συνθετικής Βιολογίας, όπως η χρήση συνδυαστικών κατασκευών και προηγμένων τεχνικών κλωνοποίησης, καθώς και πληροφορικών εργαλείων, θα κατασκευάσουμε αισθητήρες υψηλής υποκυτταρικής ευκρίνειας.

Η εργασία αυτή χωρίζεται σε δύο μέρη. Πρώτα, έγινε εκτενής και συστηματική αναζήτηση της βιβλιογραφίας για δεδομένα πρόσδεσης της διοσγενίνης σε πρωτεϊνικές επικράτειες με τη χρήση πληροφορικών πακέτων εξόρυξης κειμένου και βάσεων δεδομένων. Στη συνέχεια, οι επιλεγμένες επικράτειες πρόσδεσης σχεδιάστηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε κατασκευές δέκτες (FRET acceptors) που είχαν προηγουμένως κατασκευαστεί και δοκιμαστεί στο εργαστήριο. Οι αισθητήρες αυτοί δοκιμάστηκαν *in vivo* με παροδική έκφραση σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana* και ελέγχθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας, εξειδίκευσης και ευαισθησίας τους.

Προσδοκούμε πως τα πειραματικά δεδομένα του βιοαισθητήρα, μετά από εξωγενή προσθήκη διοσγενίνης σε φύλλα καπνού, θα αποτελέσουν απόδειξη της πλατφόρμας μας για τη γρήγορη (με τη χρήση της κατασκευής δέκτη) κατασκευή αισθητήρων για νέους μεταβολίτες.

Υλικά και μέθοδοι

Εύρεση βιβλιογραφίας

Για την εύρεση άρθρων όπου αναφέρεται η πρόσδεση της διοσγενίνης σε πρωτεϊνικές επικράτειες και γενικά σε πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε το πακέτο litsearchr [72] της γλώσσας προγραμματισμού R. Για την παραγωγή λέξεων-κλειδιών μέσω του συγκεκριμένου πακέτου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της [ιστοσελίδας](#) του πακέτου. Συνοπτικά, μέσω του αλγορίθμου RAKE αναγνωρίστηκαν από τις περιλήψεις επιλεγμένων άρθρων υποψήφιες λέξεις-κλειδιά οι οποίες επιλέχθηκαν βάσει τη σημαντικότητά τους σε δίκτυα συνύπαρξης (co-occurrence networks). Οι λέξεις-κλειδιά συνδυάστηκαν σε ένα τελικό search string και μέσω της PubMed αναζητήθηκε η βιβλιογραφία.

Σχεδιασμός επικρατειών πρόσδεσης διοσγενίνης

Οι επικράτειες πρόσδεσης που επιλέχθηκαν μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση για την ένθεση τους στο FRET Acceptor δημιουργήθηκαν με χημική σύνθεση (Integrated DNA Technologies, USA). Οι επικράτειες σχεδιάστηκαν με άκρα BsmBI (GoldenBraid) και η ένωση έγινε με one-pot dig-lig.

Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων υψηλής απόδοσης

Σε αυτήν την εργασία, τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην πλειονότητα των μετασηματισμών είχαν δημιουργηθεί ύστερα από χημική επεξεργασία με CaCl_2 (χλωριούχο ασβέστιο). Το ασβέστιο, όπως και άλλα δισθενή ιόντα, οδηγεί την προσρόφηση του DNA στη μεμβράνη των κυττάρων και κατόπιν θερμικού σοκ το DNA εισέρχεται στο κυτοσόλιο. Για την προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων υψηλής απόδοσης (10^8 - 10^9 CFU/ μg DNA) ακολουθήθηκε η μέθοδος Inoue [74] η οποία χρησιμοποιεί επιπρόσθετα αντιδραστήρια για τη διάτρηση της μεμβράνης. Ωστόσο, η διαφορά και επιτυχία επίτευξης υψηλής απόδοσης αυτού του πρωτοκόλλου με άλλες διαδικασίες είναι η επώαση των κυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία (18°C αντί 37°C). Εικάζεται πως τα χαρακτηριστικά των νεοσυντιθέμενων μεμβρανών ή η επέκταση συγκεκριμένων κυτταρικών φάσεων οφείλονται για τον αποτελεσματικό μετασηματισμό, χωρίς να έχει αποδειχθεί κάτι τέτοιο.

Κλωνοποίηση κατασκευών με ένζυμα type IIS

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι μια συλλογή τεχνικών που χρησιμοποιείται για τη συναρμολόγηση ανασυνδυασμένων μορίων DNA και την εισαγωγή τους σε μικροοργανισμούς ξενιστές. Αποτελεί θεμέλιο λίθο της Μοριακής Βιολογίας και επιδιώκει την αντιγραφή αλληλουχιών με σκοπό την ευχερέστερη μελέτη ή εκμετάλλευση τους. Η

συνήθης διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση και εισαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας σε κατάλληλο φορέα, το μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων με την ανασυνδυασμένη κατασκευή και την επιλογή των θετικών κλώνων.

Στην παρούσα εργασία, οι κατασκευές κλωνοποιήθηκαν με τη βοήθεια του type IIS ενζύμου BsmBI, δηλαδή χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του GoldenBraid. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι παρόμοια με τα προαναφερθέντα και τα εξής:

One pot dig lig

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις τελικού όγκου 10 μ L προσθέτοντας τα εξής: ~50-70 ng από κάθε κομμάτι/μέρος (φορέας-δέκτης και επικράτεια πρόσδεσης), 1 μ L 10X T4 DNA ligase buffer (New England Biolabs, USA), 1 μ L T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA), 0.8 μ L TypeIIS ένζυμο (BsmBI), ddH₂O μέχρι ο όγκος της αντίδρασης να φτάσει τα 10 μ L. Το πρόγραμμα (GB_long_V2) που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη/ένωση των τμημάτων σε θερμοκυκλοποιητή είναι το εξής: 50 κύκλοι των 42°C για 5 min και 16°C για 5 min (βέλτιστες θερμοκρασίες για BsmBI και T4 ligase αντίστοιχα), 10 min 37°C linearization των μη ανασυνδυασμένων κατασκευών και 10 min 80°C για την απενεργοποίηση των ενζύμων. Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιείται και για άλλες κατασκευές αλλάζοντας κάθε φορά τα βιομέρη και το ένζυμο.

Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a

Δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a αφέθηκαν σε πάγο για τήξη από θερμοκρασία -80°C για 20 min. Έπειτα, προστέθηκαν 5 μ L αντίδρασης dig-lig, αναδεύτηκαν ελαφρά και επώαστηκαν στον πάγο για άλλα 20-30 min. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για 1 min, επώαση στον πάγο για 2-5 min, προσθήκη 400 μ L υγρού θρεπτικού LB υπό φλόγα και επώαση για 1 h στους 37°C/210 rpm. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB Agar με το κατάλληλο αντιβιοτικό και 40 μ L 2% X-gal για blue-white screening και επώαστηκαν στους 37°C για 16 h.

Απομόνωση πλασμιδίου

Κύτταρα απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση από 5 mL υγρής καλλιέργειας LB και απομονώθηκε το πλασμίδιο χρησιμοποιώντας το εμπορικό σκεύασμα Macherey-Nagel (MN Nucleospin Plasmid). Συνοπτικά, οι οδηγίες του κατασκευαστή περιλαμβάνουν την επαναδιάλυση και λύση των κυττάρων, φυγοκέντρηση και πρόσδεση του πλασμιδίου σε στήλη μεμβράνης πυριτίου, καθαρισμός και έκλυση με διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος.

Επαλήθευση κατασκευής

Για την επαλήθευση των κατασκευών εκτελέστηκαν διαγνωστικές πέψεις. Οι αντιδράσεις περιείχαν 0.5 μ L ένζυμο περιορισμού, 1 μ L αντίστοιχο 10X buffer, ~100 ng DNA και ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει 10 μ L. Τα ένζυμα επιλέχθηκαν με το πρόγραμμα SnpGene ώστε να δίνουν ξεχωριστές ζώνες ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Μετασχηματισμός *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Δεκτικά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (50 μ L) αναμίχθηκαν με 1 μ L DNA (ύστερα από αραιώση, 10 ng/ μ L) των αντίστοιχων κατασκευών αφού τήχθηκαν από τους -80°C σε πάγο. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροδιάτρηση με το μηχάνημα Bio-rad Micropulser, είχε ισχύ 2.2 kV και διήρκησε 5.5 msec (πρόγραμμα Agr). Για την ηλεκτροδιάτρηση, το μίγμα κυττάρων-DNA μεταφέρθηκε σε ειδικές κυψελίδες (0.2 cm διάμετρο), αποστειρωμένες σε αιθανόλη, οι οποίες είχαν τοποθετηθεί στον πάγο. Ύστερα, προστέθηκαν άμεσα 950 μ L υγρού θρεπτικού LB, έγινε ανάμιξη με την μικροπιπέτα και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν πίσω στο αρχικό σωληνάριο. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 28°C/160 rpm για 2-3 h και επίστρωση υπό φλόγα σε τρυβλία LB Agar με το κατάλληλο αντιβιοτικό (καρμπενικιλίνη 100 μ g/mL).

Παροδική έκφραση σε φύλλα *Nicotiana benthamiana* *rdr6*^{-/-}

Μεταλλαγμένα (knockout) ομόζυγα φυτά *rdr6*^{-/-} μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με υπόστρωμα φυτοχώματος (compost). Τα φυτά ήταν έτοιμα για αγροεμποτισμό και ικανοποιητική έκφραση κατασκευών σε ηλικία περίπου 4 εβδομάδων ύστερα από τη μεταφύτευσή τους.

Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν μετασχηματισμένοι κλώνοι *Agrobacterium tumefaciens* σε υγρές καλλιέργειες LB όγκου 5 mL για 1-2 ημέρες με το κατάλληλο αντιβιοτικό (καρμπενικιλίνη 100 μ g/mL) στους 28°C/160 rpm. Την ημέρα του πειράματος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 3.000g για 15 min και επαναδιαλύθηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα 10 mM MgCl₂, 10 mM MES-k (pH 5,6), 100 μ M ακετοσυριγκόνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο συγκεκριμένο διάλυμα για 2-3 ώρες προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μολυσματικότητα τους από την ακετοσυριγκόνη. Έπειτα, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε παρόμοιο διάλυμα χωρίς ακετοσυριγκόνη και διαμορφώθηκε η πυκνότητα του σε OD₆₀₀=0.8. Ο εμβολιασμός στα φύλλα έγινε με αποστειρωμένες σύριγγες 1 mL χωρίς τη βελόνα τους. Η διαδικασία περιλάμβανε την δημιουργία μιας μικρής οπής και την πίεση της σύριγγας στην κάτω πλευρά του φύλλου. Μετά από σήμανση των φύλλων, έγινε έκφραση των κατασκευών για τουλάχιστον 48-72 h.

Συνεστιακή μικροσκοπία και οπτικοποίηση FRET

Για την οπτικοποίηση της συσσώρευσης του μεταβολίτη χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 συνδεδεμένο με ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss Axiovert (Zeiss, Jenna, Germany). Η μικροσκοπία έγινε με αντικειμενικό φακό 20x/0.87NA χωρίς μέσο εμβάπτισης και η οπή συνεστιακής δέσμης (pinhole) ρυθμίστηκε στα 100 μ m για όλες τις οδούς διέγερσης/ανίχνευσης (2-2.5 Airy Units ανάλογα με το μήκος κύματος διέγερσης). Η mCerulean3 διεγέρθηκε με λέιζερ διόδου μήκους κύματος 405 nm και η

εκπομπή της ανιχνεύτηκε σε εύρος μηκών κύματος 480/20 nm. Παρομοίως, η mVenusQ69M διεγέρθηκε σε μήκος κύματος 488 nm και η ανίχνευση έγινε σε εύρος 535/15 nm. Για την ανίχνευση του φαινομένου FRET έγινε διέγερση της mCerulean3 στα 405 nm ενώ η ανίχνευση έγινε σε εύρος μηκών κύματος 535/15 nm, δηλαδή το φάσμα εκπομπής της mVenusQ69M. Ως μάρτυρες για τον υπολογισμό φθορισμού ανεπιθύμητης κάλυψης φασμάτων (spectral bleedthrough) στο κανάλι ανίχνευσης FRET χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές με mCerulean3 ή mVenusQ69M ξεχωριστά. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς φορέα (μόνο αποστειρωμένο διάλυμα) για τον υπολογισμό μη ειδικού φθορισμού υποβάθρου. Οι εικόνες λήφθηκαν σε 8-bit, 512x512 pixels και η μέτρηση της μέσης έντασης φθορισμού έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Ο υπολογισμός του λόγου FRET έγινε κατά Fehr et al. 2003 [35], χρησιμοποιώντας δέκα εικόνες από ανεξάρτητες περιοχές/φύλλα ανά συνθήκη.

Αποτελέσματα

Αναζήτηση βιβλιογραφίας και εύρεση επικρατειών πρόσδεσης διοσγενίνης
Προκειμένου να κατασκευάσουμε ένα μοριακό βιοαισθητήρα για τη διοσγενίνη θα πρέπει να εισάγουμε μια επικράτεια πρόσδεσης για το συγκεκριμένο μεταβολίτη στην υπόλοιπη κατασκευή (FRET acceptor) που περιγράφεται στην επόμενη ενότητα. Πρώτα απ' όλα, όμως, θα πρέπει να εντοπίσουμε την πρωτεϊνική επικράτεια πρόσδεσης. Επειδή, απ' όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχει κάποια βάση δεδομένων που να παρέχει πληροφορίες για την πρόσδεση της διοσγενίνης, αποφασίσαμε να αναζητήσουμε οι ίδιοι τη βιβλιογραφία με πακέτα εξόρυξης κειμένου.

Για την αναζήτηση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο litsearchr της γλώσσας προγραμματισμού R και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως, δηλαδή λέξεις-κλειδιά εξάχθηκαν από περιλήψεις επιλεγμένων άρθρων και χρησιμοποιήθηκαν στην τελική αναζήτηση βιβλιογραφίας. Για την εξαγωγή των λέξεων-κλειδιών, άρθρα από βάσεις δεδομένων όπως η PubChem [75] επιλέχθηκαν βάσει την αναφορά τους σε (1) δεδομένα πρόσδεσης μεταβολιτών σε πρωτεΐνες και (2) πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκε η διοσγενίνη. Έτσι, οι λέξεις-κλειδιά που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν μαζί με δικές μας σε ένα τελικό search string το οποίο διέθετε συνώνυμα/σχετικές λέξεις της πρόσδεσης μεταβολιτών και πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τη διοσγενίνη, χωρισμένες από Boolean operators (AND/OR).

Η τελική αναζήτηση έγινε στην PubMed, μια μηχανή αναζήτησης με πρόσβαση κυρίως στη βιβλιογραφική βάση MEDLINE [71], απ' όπου προέκυψαν 915 άρθρα εκ των οποίων 18 περιείχαν δεδομένα πρόσδεσης της διοσγενίνης. Τα δεδομένα αυτά βασίζονται κυρίως σε προσομοιώσεις πρόσδεσης μορίων (docking studies) ενώ οι πρωτεΐνες στόχοι περιλαμβάνουν υποδοχείς και ένζυμα όπου η διοσγενίνη μπορεί να προσδένονταν αλλοστερικά. Οι περισσότεροι υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών με παραδείγματα τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων. Εν τέλει, επιλέχθηκε η επικράτεια πρόσδεσης προγεστερόνης του αντίστοιχου υποδοχέα για ένθεση στο FRET acceptor καθώς η διοσγενίνη έχει παρόμοια χημική δομή με την προγεστερόνη. Επιπλέον, η επικράτεια πρόσδεσης διατηρεί τη στερεοδιαμόρφωση της εκτός του υποδοχέα, ενώ παρουσία προσδέτη δεν διμερίζεται [76] και πιθανώς επάγεται αλλαγή στη διαμόρφωση της [77].

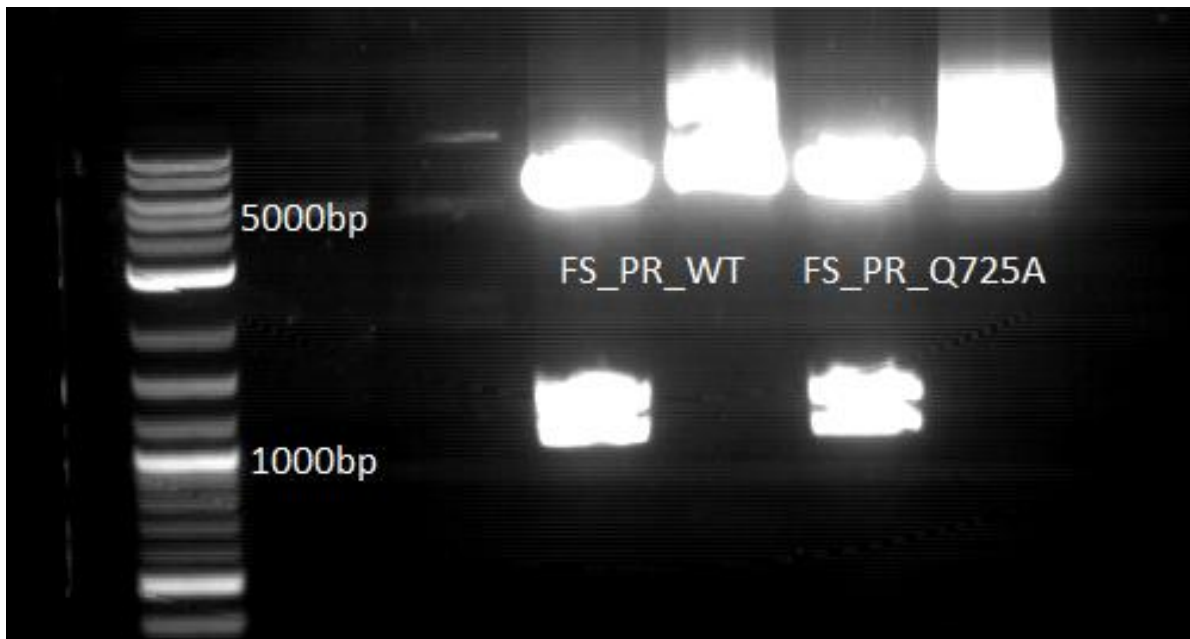
Κατασκευή πρότυπων βιοαισθητήρων διοσγενίνης με τη χρήση του FRET Acceptor

Για την γρήγορη κατασκευή εξατομικευμένων και τυποποιημένων αισθητήρων χρησιμοποιήσαμε ένα δέκτη FRET (FRET Acceptor), κατασκευασμένο προηγουμένως στο εργαστήριο. Η συγκεκριμένη κατασκευή αποτελείται από τις φθορίζουσες πρωτεΐνες ενός φυσιολογικού αισθητήρα FRET (στην περίπτωση μας mCerulean3 και mVenusQ69M), μια μεταγραφική μονάδα LacZa και συνδεδεμένες αλληλουχίες (linkers) μεταξύ τους (Εικόνα 11). Οι συνδεδεμένες αλληλουχίες κωδικοποιούν αμινοξέα με μικρή πλευρική αλυσίδα ώστε η αμινοξική αλληλουχία μεταξύ των επικρατειών να είναι εύκαμπτη. Επιπλέον, οι ίδιες αλληλουχίες διαθέτουν από μία θέση περιορισμού η καθεμία για το *TypellS* ένζυμο BsmBI. Έτσι, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του GoldenBraid μπορούμε να αντικαταστήσουμε την κασέτα έκφρασης LacZa με την επικράτεια πρόσδεσης του εκάστοτε μεταβολίτη. Οι συγκεκριμένες θέσεις είναι τοποθετημένες έτσι, ώστε να επιτρέπεται η συνεχής έκφραση χωρίς τη δημιουργία πρόωρου κωδικονίου λήξης ή μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου (frame-shift) μετά την ένθεση της επικράτειας. Η όλη διαδικασία μοιάζει τη συναρμολόγηση L1 μεταγραφικών μονάδων από L0 parts ενώ η χρήση του GoldenBraid και του LacZa (γονίδιο επιλογής) καθιστά γρήγορα, εύκολα και φτηνά ανταλλάξιμη της επικράτεια πρόσδεσης του μεταβολίτη.

Με σκοπό τη γρήγορη επιβεβαίωση της λειτουργίας του βιοαισθητήρα προχωρήσαμε στην κατασκευή φυτικών μεταγραφικών μονάδων. Η φυτική κατασκευή του δέκτη FRET διαθέτει τον υποκινητή του *Lotus Japonicus* LjUbi500i, ο οποίος οδηγεί στην έκφραση τόσο στο *L. japonicus*, όσο και στη *N. benthamiana* (Garagounis C. *unpublished data*), επιτρέποντας την παροδική έκφραση της κατασκευής στα φύλλα του. Για τον τερματισμό της μεταγραφής χρησιμοποιείται ο κλασικός τερματιστής του γονιδίου συνθάσης της νοπαλίνης του *A. tumefaciens* tNOS. Για την καλύτερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κατασκευάστηκε και ένας ελαττωματικός βιοαισθητήρας (mutant) που χρησιμοποιήθηκε ως negative control. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας αναμένεται να μην προσδένει διοσγενίνη και έτσι δεν θα παρατηρείται κάποια αλλαγή στο λόγο FRET. Βάσει της βιβλιογραφίας [78,79], για τη μηδενική ικανότητα πρόσδεσης τόσο της προγεστερόνης όσο και της διοσγενίνης, μεταλλάχτηκε η γλουταμίνη της θέσης 725 του υποδοχέα προγεστερόνης σε αλανίνη (Q725A). Οι μεταγραφικές μονάδες που προέκυψαν επιβεβαιώθηκαν μέσω πέψης με ένζυμα περιορισμού (Εικόνα 12).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του φυτικού δέκτη FRET με τη χρήση του προγράμματος SnapGene.

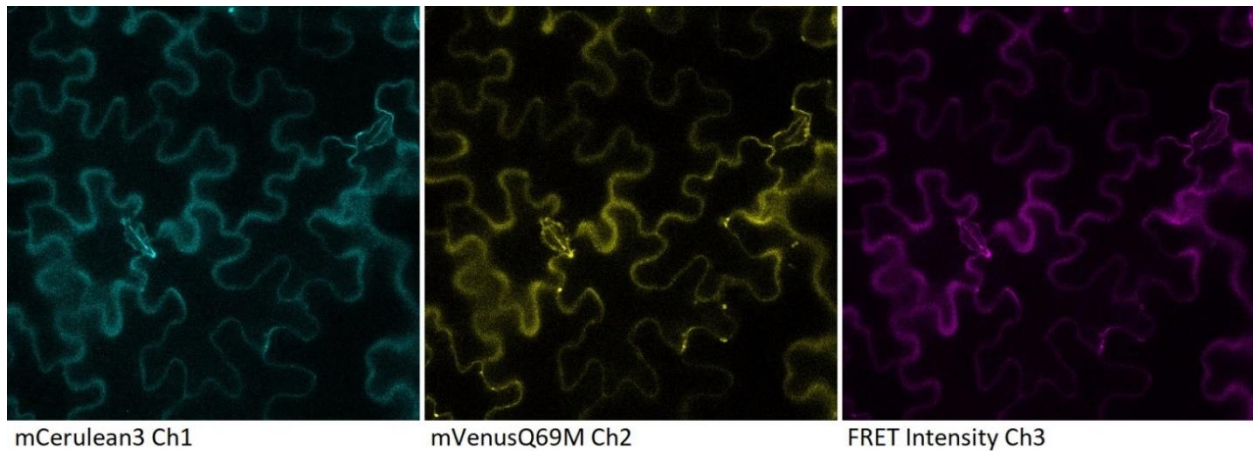


Εικόνα 12. Διαγνωστικές πέψεις με HindIII που επιβεβαιώνουν τις φυτικές μεταγραφικές μονάδες του λειτουργικού (WT) και ελαττωματικού/κοντρόλ (Q725A) βιοαισθητήρα διοσγενίνης. Το αναμενόμενο προφίλ ζωνών για τους θετικούς κλώνους είναι: 1081 bp, 1275 bp, 5827 bp (cut) και 8183 bp (uncut). Ο μάρτυρας (ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000 bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

Έκφραση σε φυτά και μελέτη των βιοαισθητήρων διοσγενίνης

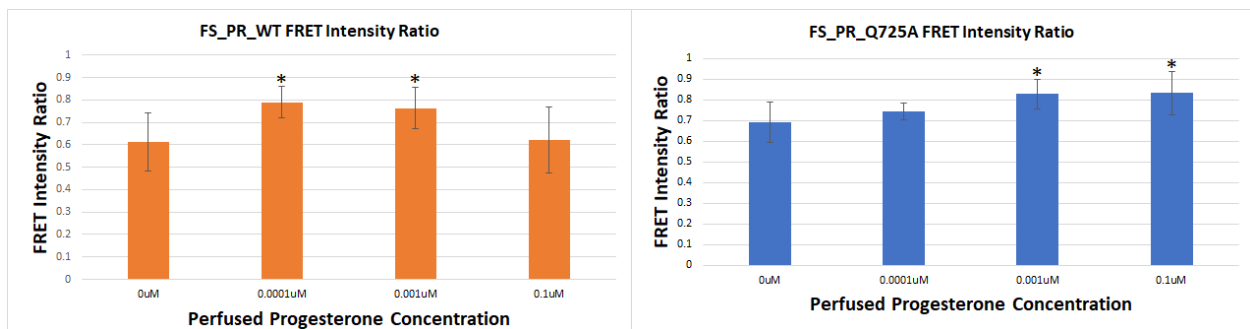
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τη λειτουργία του βιοαισθητήρα διοσγενίνης προχωρήσαμε στην έκφραση του σε φυτά με αγροεμποτισμό. Για την έκφραση χρησιμοποιήσαμε το φυτό μοντέλο *Nicotiana benthamiana*, ιδανικό στην εύκολη και παροδική έκφραση διαγονιδίων στα φύλλα του. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε *rdr6*^{-/-} μεταλλαγμένες σειρές καθώς υπήρχε πιθανότητα καταστολής της έκφρασης μέσω siRNAs λόγω της μεγάλης ομοιότητας των αλληλουχιών του δότη και δέκτη.

Στην εικόνα παρακάτω (Εικόνα 13) παρατηρείται η επιτυχής έκφραση του βιοαισθητήρα σε φύλλα καπνού ύστερα από 2-3 μέρες. Τα τρία κανάλια με τη σειρά είναι (1) Cerulean (δότης) με κυανό χρώμα, (2) Venus (δέκτης) με κίτρινο και (3) FRET με ματζέντα. Για την οπτικοποίηση του φαινομένου FRET χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις προγεστερόνης, οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση τη συγγένεια πρόσδεσης στον υποδοχέα της ώστε να παρατηρηθεί κάποια αλλαγή στο λόγο FRET.

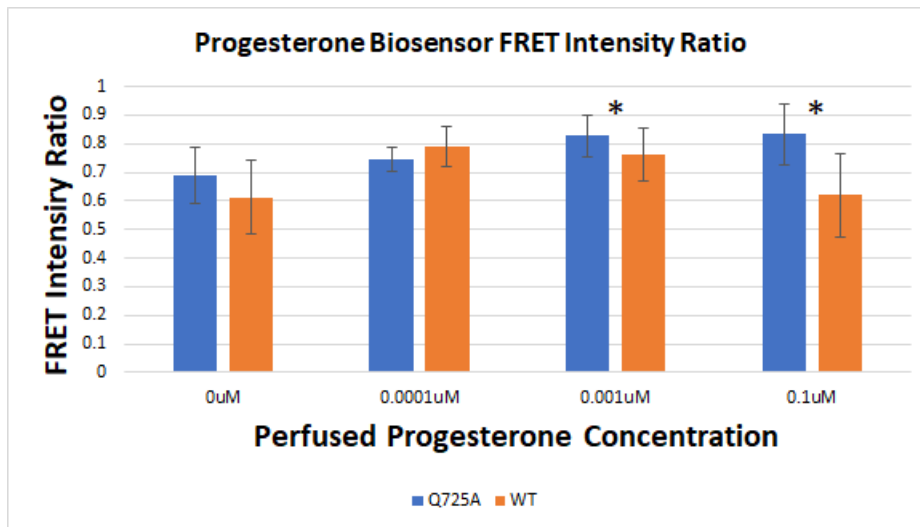


Εικόνα 13. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας σε φύλλα καπνού, μετασχηματισμένα με τον FS_PR_Q725A. Στο κανάλι 1 (Ch1) παρατηρείται ο φθορισμός του δότη, στο κανάλι 2 (Ch2) του δέκτη και στο κανάλι 3 (Ch3) η ένταση FRET. Ο βιοαισθητήρας εκφράζεται ικανοποιητικά χωρίς να υπάρχει ενδοκυτταρικά συσσώρευση του.

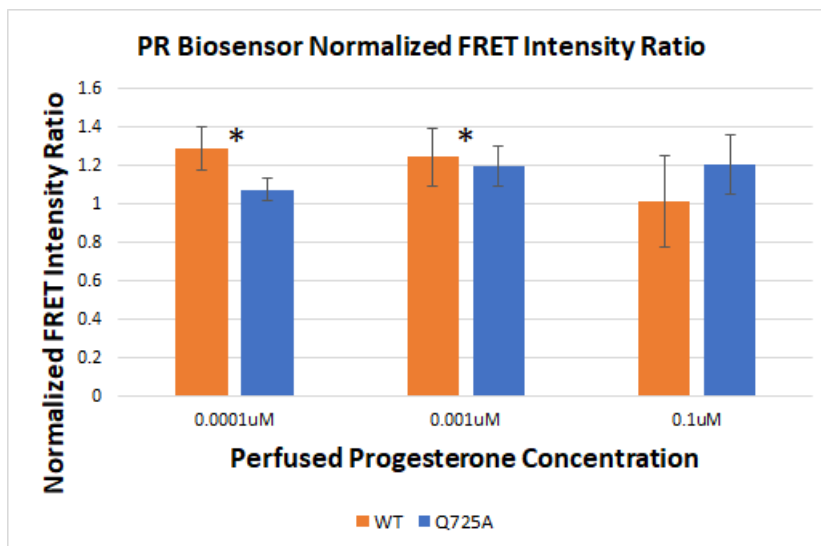
Για κάθε συγκέντρωση/συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν δέκα εικόνες στον υπολογισμό του λόγου FRET (Ch3/Ch1). Στην Εικόνα 14 παρατηρούνται τα διαγράμματα του λόγου FRET του βιοαισθητήρα (FS_PR_WT) και του βιοαισθητήρα control (FS_PR_Q725A, mutant) ενώ στην Εικόνα 15 απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ των δύο αισθητήρων. Στατιστική σημαντικότητα πρέπει να παρατηρείται ιδανικά στο φυσιολογικό βιοαισθητήρα (FS_PR_WT) και κατά τη σύγκριση του με το control (FS_PR_Q725A).



Εικόνα 14. Διαγράμματα του λόγου FRET του λειτουργικού βιοαισθητήρα (αριστερά) και του βιοαισθητήρα control (δεξιά). Η στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.05$) απεικονίζεται με αστερίσκο (*) και η στατιστική ανάλυση έγινε με two-tailed paired t-test. Κατά την ανάλυση, σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν δέκα εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από ανεξάρτητες περιοχές/φύλλα. Στατιστική σημαντικότητα παρατηρείται και στους δύο αισθητήρες κατά τη σύγκριση τους με τη συνθήκη 0 μM.



Εικόνα 15. Σύγκριση των δύο βιοαισθητήρων (FS_PR_WT, FS_PR_Q725A) μεταξύ τους για τις ίδιες συνθήκες/συγκεντρώσεις. Η στατιστική σημαντικότητα (*) υποδεικνύει πως η αλλαγή του λόγου FRET οφείλεται στην πρόσδεση της προγεστερόνης στην επικράτεια πρόσδεσης της.



Εικόνα 16. Σύγκριση των δύο βιοαισθητήρων (FS_PR_WT, FS_PR_Q725A) μεταξύ τους για τις ίδιες συνθήκες/συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση με το προηγούμενο διάγραμμα, εδώ παρατηρείται η μεταβολή του λόγου FRET έναντι της μηδενικής συγκέντρωσης καθώς συγκρίνονται διαφορετικοί αισθητήρες/φυτά. Η στατιστική σημαντικότητα (*) υποδεικνύει πως η αλλαγή του λόγου FRET οφείλεται στην πρόσδεση της προγεστερόνης στην επικράτεια πρόσδεσης της.

Στα διαγράμματα της Εικόνας 14 παρατηρείται πως αυξανόμενες συγκεντρώσεις προγεστερόνης επηρέασαν το λόγο FRET του βιοαισθητήρα FS_PR_WT στατιστικώς σημαντικά (συνθήκες 0.0001μM, 0.001μM), υποδεικνύοντας ότι ο βιοαισθητήρας είναι λειτουργικός υπό αυτές τις συνθήκες. Ωστόσο, στατιστική σημαντικότητα παρατηρείται και σε δύο συνθήκες (0.001μM, 0.1μM) του FS_PR_Q725A που κανονικά δεν προσδένει προγεστερόνη και άρα δεν πρέπει να αλλάζει ο λόγος FRET. Ακόμη, παρατηρείται πως ο αισθητήρας FS_PR_WT δεν ανταποκρίνεται ανάλογα της αυξανόμενης συγκέντρωσης προγεστερόνης, σε αντίθεση, παραδόξως, με τον FS_PR_Q725A. Εν τέλει, συγκρίνοντας τους δύο βιοαισθητήρες μεταξύ τους (Εικόνα 15) φαίνεται πως η αλλαγή στο λόγο FRET οφείλεται στην πρόσδεση της προγεστερόνης στην επικράτεια της (συνθήκες 0.001μM, 0.1μM). Στην Εικόνα 16 παρατηρείται και η σύγκριση της μεταβολής του λόγου FRET των αισθητήρων ως προς τη μηδενική συγκέντρωση.

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να κατασκευάσουμε ένα μοριακό βιοαισθητήρα διοσγενίνης, πράγμα σημαντικό στη μελέτη της φυσιολογίας φυτών και διαφόρων μοριακών μηχανισμών. Οι βιοαισθητήρες τύπου FRET αποτελούν μια καλή λύση στη οπτικοποίηση της συσσώρευσης μεταβολιτών, όμως, απ' όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει κάποια πλατφόρμα-εργαλειοθήκη διαθέσιμη στην κοινότητα Βιολογίας Φυτών. Η κατασκευή τέτοιων αισθητήρων συνήθως γίνεται από μεμονωμένες προσπάθειες καταναλώνοντας πολύτιμο χρόνο και χρήματα. Μάλιστα, η τεράστια πολυπλοκότητα και αριθμός των δευτερογενών μεταβολιτών δυσκολεύει ακόμα περισσότερο το παραπάνω έργο.

Η εφαρμογή των αρχών της Συνθετικής Βιολογίας, όπως η τυποποίηση, για την επιτάχυνση της όλης διαδικασίας σχεδιασμού και κατασκευής αποτελεί πλέον μονόδρομο. Έτσι, εκτός της ανίχνευσης διοσγενίνης για τη διευκόλυνση της βασικής έρευνας και εφαρμογών που αφορούν τον άνθρωπο, σκοπός της εργασίας ήταν η απόδειξη της πλατφόρμας μας για ταχεία κατασκευή αισθητήρων και η επέκταση των διαθέσιμων επικρατειών πρόσδεσης. Γι' αυτό και η κατασκευή του βιοαισθητήρα διοσγενίνης έγινε με την ένθεση της επικράτειας πρόσδεσης σε μια τυποποιημένη κατασκευή δέκτη (FRET acceptor), προηγουμένως συναρμολογημένη στο εργαστήριο. Επομένως, η κατασκευή του βιοαισθητήρα είχε ελάχιστο χρόνο τριών ημερών ενώ δύναται η δυνατότητα περαιτέρω επιτάχυνσης μέσω της αυτοματοποίησης του σχεδιασμού εκκινητών, των πρωτοκόλλων κατασκευής και του χαρακτηρισμού των βιοαισθητήρων. Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει πλέον και η επιστήμη ρομποτικής, μέσω της διαχείρισης ρευστών, μειώνοντας το χρόνο απασχόλησης του ερευνητή και την πιθανότητα ανθρώπινου λάθους.

Για την κατασκευή όμως ενός λειτουργικού βιοαισθητήρα πρέπει πρώτα να αναζητήσουμε υποψήφιες επικράτειες πρόσδεσης, η επιλογή των οποίων γίνεται υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Αρχικά, οι επικράτειες πρόσδεσης πρέπει να μην χρησιμοποιούν τον εκάστοτε μεταβολίτη ως υπόστρωμα κάποιας αντίδρασης. Έτσι, πρωτεΐνες στόχοι όπως ένζυμα πρέπει να απορρίπτονται καθώς μπορούν να τροποποιήσουν το μεταβολίτη και να αλλάξουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωσή του. Ιδανικά, οι επικράτειες πρόσδεσης προέρχονται από υποδοχείς, μεταφορείς ή πρωτεΐνες που προσδένουν το μεταβολίτη αλλοστερικά. Ακόμη, οι υποψήφιες επικράτειες δεν πρέπει να είναι ογκώδεις και πρέπει να επάγεται κάποια αλλαγή στη διαμόρφωσή τους κατά την πρόσδεση προκειμένου να συμβεί το φαινόμενο FRET και να παρατηρηθεί κάποια αλλαγή αντίστοιχα. Συνεπώς, ύστερα της βιβλιογραφικής αναζήτησης, καταλήξαμε στην επικράτεια πρόσδεσης του υποδοχέα προγεστερόνης, καθώς εκτός των άλλων δεν διμερίζεται όπως επικράτειες άλλων πυρηνικών υποδοχέων και πιθανώς προσδένει τη διοσγενίνη λόγω της χημικής ομοιότητας της με την προγεστερόνη.

Με την παραπάνω επικράτεια προχωρήσαμε στη συνέχεια στην κατασκευή και μελέτη του αισθητήρα *in vivo*. Από τη στατιστική ανάλυση των δύο αισθητήρων (WT, Q725A) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις προγεστερόνης φαίνεται μια σημαντική διαφορά στο λόγο FRET που υποδεικνύει πως ο βιοαισθητήρας είναι λειτουργικός και η αλλαγή του λόγου FRET οφείλεται στην πρόσδεση της προγεστερόνης στην επικράτεια πρόσδεσης του. Ωστόσο, υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και στο λόγο FRET μεταξύ των συνθηκών του βιοαισθητήρα control που δεν προσδένει προγεστερόνη. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε κάποια γραμμική σχέση συγκέντρωσης/σήματος στο φυσιολογικό αισθητήρα. Τα παραπάνω μπορεί να οφείλονται στον αυτοφθορισμό που παράγεται από στοματικά κύτταρα, κύτταρα τριχοειδών και γενικότερα από χλωροπλάστες των φύλλων προκαλώντας θετικό σφάλμα κατά την ανίχνευση του φθορισμού του αισθητήρα. Εν πάση περιπτώσει, απαιτούνται περισσότερα πειράματα για να υποστηριχτούν τα υπάρχοντα αποτελέσματα.

Ένα ακόμα σημαντικό ζήτημα ήταν η καταστολή έκφρασης των φυτικών κατασκευών μέσω RNAi. Συγκεκριμένα, το μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και η ομοιότητα των φθορισμοφόρων οδηγούν στην παραγωγή siRNAs από τις φυτικές πολυμεράσες του RNA (RNA dependent RNA polymerase 6, RDR6). Έτσι, για να μην οδηγηθούμε σε σίγηση/αποδόμηση του mRNA του διαγονιδίου, χρησιμοποιήσαμε ομόζυγα *rdr6^{-/-}* φυτά. Ωστόσο, υπάρχει η δυνατότητα συν-αγροεμποτισμού του βιοαισθητήρα μαζί με ένα φορέα καταστολής της σίγησης (έκφραση p19 suppressor of silencing), αν και η πιθανότητα συν-μετασηματισμού των κυττάρων είναι χαμηλότερη συγκριτικά με το μετασηματισμό ενός φορέα. Μια εναλλακτική λύση, χωρίς τα μειονεκτήματα χρήσης δύο φορέων, αποτελεί η προσθήκη μιας μεταγραφικής μονάδας του p19 suppressor of silencing στο φορέα έκφρασης του βιοαισθητήρα. Και οι δύο παραπάνω επιλογές επιτρέπουν την παροδική έκφραση των βιοαισθητήρων σε φυτά μη-μοντέλα για τα οποία δεν υπάρχουν μεταλλαγμένες σειρές (*rdr6^{-/-}*).

Κλείνοντας, σε επόμενα πειράματα σκοπεύουμε στη βακτηριακή έκφραση και απομόνωση του αισθητήρα προκειμένου να τον μελετήσουμε *in vitro* και να επιβεβαιώσουμε τη λειτουργικότητά του, χωρίς τυχόν αυτοφθορισμό από άλλα μόρια, αποφεύγοντας έτσι θετικά σφάλματα. Τέλος, ο αισθητήρας θα μπορούσε να εκφραστεί σε φυτά που φυσιολογικά παράγουν διοσγενίνη, όπως η *Trigonella foenum-graecum*, για την απόδειξη της λειτουργικότητάς του αισθητήρα διοσγενίνης και γενικότερα της πλατφόρμας μας για ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτά μη-μοντέλα.

Βιβλιογραφία

1. Hof AR, Dymond CC, Mladenoff DJ. 2017. Climate change mitigation through adaptation: the effectiveness of forest diversification by novel tree planting regimes. *Ecosphere*. 8(11):e01981. doi:10.1002/ecs2.1981.
2. Significance of medicinal plants in human life. 2018 Jan 1. *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*:1–24. doi:10.1016/B978-0-08-102071-5.00001-5.
3. Rates SMK. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicol*. 39(5):603–613. doi:10.1016/S0041-0101(00)00154-9.
4. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. 2002. *International Journal for Parasitology*. 32(13):1655–1660. doi:10.1016/S0020-7519(02)00194-7.
5. Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG. 1992. Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol*. 19(6):646–662.
6. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. 2001. *Plant Science*. 161(5):839–851. doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
7. D’Auria JC, Gershenzon J. 2005. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*. 8(3):308–316. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.012.
8. Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. 2017 Jan 1. *Pharmacognosy*:93–100. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00007-X.
9. Wang S, Alseekh S, Fernie AR, Luo J. 2019. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular Plant*. 12(7):899–919. doi:10.1016/j.molp.2019.06.001.
10. Uslu VV, Grossmann G. 2016. The biosensor toolbox for plant developmental biology. *Current Opinion in Plant Biology*. 29:138–147. doi:10.1016/j.pbi.2015.12.001.
11. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4):426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
12. Kothari V, Gupta A, Naraniwal M. 2012. Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts A comparative study. [accessed 2021 Jul 15]. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:101:1-201209206093>.
13. Kueger S, Steinhauser D, Willmitzer L, Giavalisco P. 2012. High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions: Metabolite annotation and subcellular distribution. *The Plant Journal*. 70(1):39–50. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04902.x.
14. Garagounis C, Delkis N, Papadopoulou KK. 2021. Unraveling the roles of plant specialized metabolites: using synthetic biology to design molecular biosensors. *New Phytol*. 231(4):1338–1352. doi:10.1111/nph.17470.
15. De Col V, Fuchs P, Nietzel T, Elsässer M, Voon CP, Candéo A, Seeliger I, Fricker MD, Grefen C, Møller IM, et al. 2017. ATP sensing in living plant cells reveals tissue gradients and stress dynamics of energy physiology. *Hardtke CS, editor. eLife*. 6:e26770. doi:10.7554/eLife.26770.
16. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1787(5):468–475. doi:10.1016/j.bbabi.2009.01.020.

17. Swanson SJ, Choi W-G, Chanoca A, Gilroy S. 2011. In Vivo Imaging of Ca²⁺, pH, and Reactive Oxygen Species Using Fluorescent Probes in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 62(1):273–297. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103832.
18. Herud-Sikimić O, Stiel AC, Kolb M, Shanmugaratnam S, Berendzen KW, Feldhaus C, Höcker B, Jürgens G. 2021. A biosensor for the direct visualization of auxin. *Nature.* 592(7856):768–772. doi:10.1038/s41586-021-03425-2.
19. Wright RC, Nemhauser J. 2019. Plant Synthetic Biology: Quantifying the “Known Unknowns” and Discovering the “Unknown Unknowns.” *Plant Physiol.* 179(3):885–893. doi:10.1104/pp.18.01222.
20. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 49(6):439–462. doi:10.3109/10409238.2014.953628.
21. The origin and evolution of the diosgenin biosynthetic pathway in yam. 2021. *Plant Communications.* 2(1):100079. doi:10.1016/j.xplc.2020.100079.
22. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. 2003. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology.* 32(6):688–705. doi:10.1016/S0141-0229(03)00029-2.
23. Jesus M, Martins APJ, Gallardo E, Silvestre S. 2016. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry.* 2016:1–16. doi:10.1155/2016/4156293.
24. Jares-Erijman EA, Jovin TM. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol.* 21(11):1387–1395. doi:10.1038/nbt896.
25. Kenworthy AK. 2001. Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods.* 24(3):289–296. doi:10.1006/meth.2001.1189.
26. Hachet-Haas M, Converset N, Marchal O, Matthes H, Gioria S, Galzi J-L, Lecat S. 2006. FRET and colocalization analyzer—A method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in. *Microsc Res Tech.* 69(12):941–956. doi:10.1002/jemt.20376.
27. The use of FRET imaging microscopy to detect protein–protein interactions and protein conformational changes in vivo. 2001. *Current Opinion in Structural Biology.* 11(5):573–578. doi:10.1016/S0959-440X(00)00249-9.
28. Frommer WB, Davidson MW, Campbell RE. 2009. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev.* 38(10):2833. doi:10.1039/b907749a
29. Ellenberg J. 1999. Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends in Cell Biology.* 9(2):52–56. doi:10.1016/S0962-8924(98)01420-2.
30. Qian J, Yao B, Wu C. 2014. Fluorescence resonance energy transfer detection methods: Sensitized emission and acceptor bleaching. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 8(5):1375–1380. doi:10.3892/etm.2014.1928.
31. Hum JM, Siegel AP, Pavalko FM, Day RN. 2012. Monitoring Biosensor Activity in Living Cells with Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences.* 13(11):14385–14400. doi:10.3390/ijms131114385.
32. Correcting Confocal Acquisition to Optimize Imaging of Fluorescence Resonance Energy Transfer by Sensitized Emission. 2004. *Biophysical Journal.* 86(4):2517–2529. doi:10.1016/S0006-3495(04)74307-6.

33. Banerjee S, Garcia LR, Versaw WK. 2016. Quantitative Imaging of FRET-Based Biosensors for Cell- and Organelle-Specific Analyses in Plants. *Microsc Microanal.* 22(2):300–310. doi:10.1017/S143192761600012X.
34. Padilla-Parra S, Tramier M. 2012. FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays.* 34(5):369–376. doi:10.1002/bies.201100086.
35. Fehr M, Lalonde S, Ehrhardt DW, Frommer WB. 2004. Live Imaging of Glucose Homeostasis in Nuclei of COS-7 Cells. *Journal of Fluorescence.* 14(5):603–609. doi:10.1023/B:JOFL.0000039347.94943.99.
36. Basics of FRET Microscopy. Nikon's MicroscopyU. [accessed 2021 Jul 18]. <https://www.microscopyu.com/applications/fret/basics-of-fret-microscopy>.
37. Liu W, Stewart CN. 2015. Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science.* 20(5):309–317. doi:10.1016/j.tplants.2015.02.004.
38. Endy D. 2005. Foundations for engineering biology. *Nature.* 438(7067):449–453. doi:10.1038/nature04342.
39. Lazebnik Y. 2004. Can a biologist fix a radio? ? or, what I learned while studying apoptosis. *Biochemistry (Moscow).* 69(12):1403–1406. doi:10.1007/s10541-005-0088-1.
40. Flores Bueso Y, Tangney M. 2017. Synthetic Biology in the Driving Seat of the Bioeconomy. *Trends in Biotechnology.* 35(5):373–378. doi:10.1016/j.tibtech.2017.02.002.
41. Beal J, Goñi-Moreno A, Myers C, Hecht A, de Vicente M del C, Parco M, Schmidt M, Timmis K, Baldwin G, Friedrichs S, et al. 2020. The long journey towards standards for engineering biosystems. *EMBO reports.* 21(5):e50521. doi:10.15252/embr.202050521.
42. Knight T. 2003. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. [accessed 2021 Jul 23]. <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/21168>.
43. Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, de Las Heras A, Páez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nikel PI, et al. 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D666–675. doi:10.1093/nar/gks1119.
44. Galdzicki M, Clancy KP, Oberortner E, Pocock M, Quinn JY, Rodriguez CA, Roehner N, Wilson ML, Adam L, Anderson JC, et al. 2014. The Synthetic Biology Open Language (SBOL) provides a community standard for communicating designs in synthetic biology. *Nat Biotechnol.* 32(6):545–550. doi:10.1038/nbt.2891.
45. Beal J, Haddock-Angelli T, Farny N, Rettberg R. 2018. Time to Get Serious about Measurement in Synthetic Biology. *Trends in Biotechnology.* 36(9):869–871. doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.003.
46. Canton B, Labno A, Endy D. 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotechnol.* 26(7):787–793. doi:10.1038/nbt1413.
47. Agapakis CM, Silver PA. 2009. Synthetic biology: exploring and exploiting genetic modularity through the design of novel biological networks. *Mol BioSyst.* 5(7):704. doi:10.1039/b901484e.
48. de Lorenzo V. 2011. Beware of metaphors: Chasses and orthogonality in synthetic biology. *Bioengineered Bugs.* 2(1):3–7. doi:10.4161/bbug.2.1.13388.
49. Calero P, Nikel PI. 2019. Chasing bacterial *chassis* for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microb Biotechnol.* 12(1):98–124. doi:10.1111/1751-7915.13292.
50. Jessop-Fabre MM, Sonnenschein N. 2019. Improving Reproducibility in Synthetic Biology. *Front Bioeng Biotechnol.* 7:18. doi:10.3389/fbioe.2019.00018.

51. Chao R, Mishra S, Si T, Zhao H. 2017. Engineering biological systems using automated biofoundries. *Metabolic Engineering*. 42:98–108. doi:10.1016/j.ymben.2017.06.003.
52. Federici F, Rudge TJ, Pollak B, Haseloff J, Gutiérrez RA. 2013. Synthetic Biology: opportunities for Chilean bioindustry and education. *Biol Res*. 46(4):383–393. doi:10.4067/S0716-97602013000400010.
53. Pouvreau B, Vanhercke T, Singh S. 2018. From plant metabolic engineering to plant synthetic biology: The evolution of the design/build/test/learn cycle. *Plant Science*. 273:3–12. doi:10.1016/j.plantsci.2018.03.035.
54. Gill RT, Halweg-Edwards AL, Clauzet A, Way SF. 2016. Synthesis aided design: The biological design-build-test engineering paradigm?: *Synthesis Aided Design*. *Biotechnol Bioeng*. 113(1):7–10. doi:10.1002/bit.25857.
55. Hutchison CA, Chuang R-Y, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, Gill J, Kannan K, Karas BJ, Ma L, et al. 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 351(6280). doi:10.1126/science.aad6253. [accessed 2021 Jul 24]. <https://science.sciencemag.org/content/351/6280/aad6253>.
56. Slusarczyk AL, Lin A, Weiss R. 2012. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nat Rev Genet*. 13(6):406–420. doi:10.1038/nrg3227.
57. James JR, Vale RD. 2012. Biophysical mechanism of T-cell receptor triggering in a reconstituted system. *Nature*. 487(7405):64–69. doi:10.1038/nature11220.
58. Ortega C, Abreu C, Oppezzo P, Correa A. 2019. Overview of High-Throughput Cloning Methods for the Post-genomic Era. *Methods Mol Biol*. 2025:3–32. doi:10.1007/978-1-4939-9624-7_1.
59. Katzen F. 2007. Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov*. 2(4):571–589. doi:10.1517/17460441.2.4.571.
60. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One*. 4(5):e5553. doi:10.1371/journal.pone.0005553.
61. Patron NJ, Orzaez D, Marillonnet S, Warzecha H, Matthewman C, Youles M, Raitskin O, Leveau A, Farré G, Rogers C, et al. 2015. Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytol*. 208(1):13–19. doi:10.1111/nph.13532.
62. Vazquez-Vilar M, Orzaez D, Patron N. 2018. DNA assembly standards: Setting the low-level programming code for plant biotechnology. *Plant Science*. 273:33–41. doi:10.1016/j.plantsci.2018.02.024.
63. Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert T-M, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, Marillonnet S. 2014. A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synth Biol*. 3(11):839–843. doi:10.1021/sb4001504.
64. Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palaci J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. 2013. GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology. *PLANT PHYSIOLOGY*. 162(3):1618–1631. doi:10.1104/pp.113.217661.
65. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. 2011. A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. Peccoud J, editor. *PLoS ONE*. 6(2):e16765. doi:10.1371/journal.pone.0016765.
66. Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, Orzaez D. 2011. GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. Peccoud J, editor. *PLoS ONE*. 6(7):e21622. doi:10.1371/journal.pone.0021622.

67. Hearst MA. 1999. Untangling text data mining. In: Proceedings of the 37th annual meeting of the Association for Computational Linguistics on Computational Linguistics. College Park, Maryland: Association for Computational Linguistics. (ACL '99). p. 3–10. [accessed 2021 Jul 28]. <https://doi.org/10.3115/1034678.1034679>.
68. Data mining techniques for customer relationship management. 2002. *Technology in Society*. 24(4):483–502. doi:10.1016/S0160-791X(02)00038-6.
69. Papanikolaou N, Pavlopoulos GA, Theodosiou T, Iliopoulos I. 2015. Protein–protein interaction predictions using text mining methods. *Methods*. 74:47–53. doi:10.1016/j.ymeth.2014.10.026.
70. Smalheiser NR, Swanson DR. 1996. Linking estrogen to Alzheimer’s disease: An informatics approach. *Neurology*. 47(3):809–810. doi:10.1212/WNL.47.3.809.
71. Masic I, Milinovic K. 2012. On-line Biomedical Databases-the Best Source for Quick Search of the Scientific Information in the Biomedicine. *Acta Inform Med*. 20(2):72. doi:10.5455/aim.2012.20.72-84.
72. Grames EM, Stillman AN, Tingley MW, Elphick CS. 2019. An automated approach to identifying search terms for systematic reviews using keyword co-occurrence networks. Freckleton R, editor. *Methods Ecol Evol*. 10(10):1645–1654. doi:10.1111/2041-210X.13268.
73. Rose S, Engel D, Cramer N, Cowley W. 2010. Automatic Keyword Extraction from Individual Documents. In: *Text Mining*. John Wiley & Sons, Ltd. p. 1–20. [accessed 2021 Jul 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470689646.ch1>.
74. Im, H. (2011). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: “Ultra Competent” Cells. *Bio-101*: e143. DOI: 10.21769/BioProtoc.143.
75. Kim S, Thiessen PA, Cheng T, Yu B, Shoemaker BA, Wang J, Bolton EE, Wang Y, Bryant SH. 2016. Literature information in PubChem: associations between PubChem records and scientific articles. *J Cheminform*. 8:32. doi:10.1186/s13321-016-0142-6.
76. Tetel MJ, Jung S, Carbajo P, Ladtkow T, Skafar DF, Edwards DP. 1997. Hinge and amino-terminal sequences contribute to solution dimerization of human progesterone receptor. *Mol Endocrinol*. 11(8):1114–1128. doi:10.1210/mend.11.8.9963.
77. Zheng L, Lin VC, Mu Y. 2016. Exploring Flexibility of Progesterone Receptor Ligand Binding Domain Using Molecular Dynamics. *PLOS ONE*. 11(11):e0165824. doi:10.1371/journal.pone.0165824.
78. Mordasini T, Curioni A, Bursi R, Andreoni W. 2003. The Binding Mode of Progesterone to Its Receptor Deduced from Molecular Dynamics Simulations. *ChemBioChem*. 4(2–3):155–161. doi:10.1002/cbic.200390026.
79. Letz M, Bringmann P, Mann M, Mueller-Fahrnow A, Reipert D, Scholz P, Wurtz JM, Egner U. 1999. Investigation of the binding interactions of progesterone using muteins of the human progesterone receptor ligand binding domain designed on the basis of a three-dimensional protein model. *Biochim Biophys Acta*. 1429(2):391–400. doi:10.1016/s0167-4838(98)00249-0.