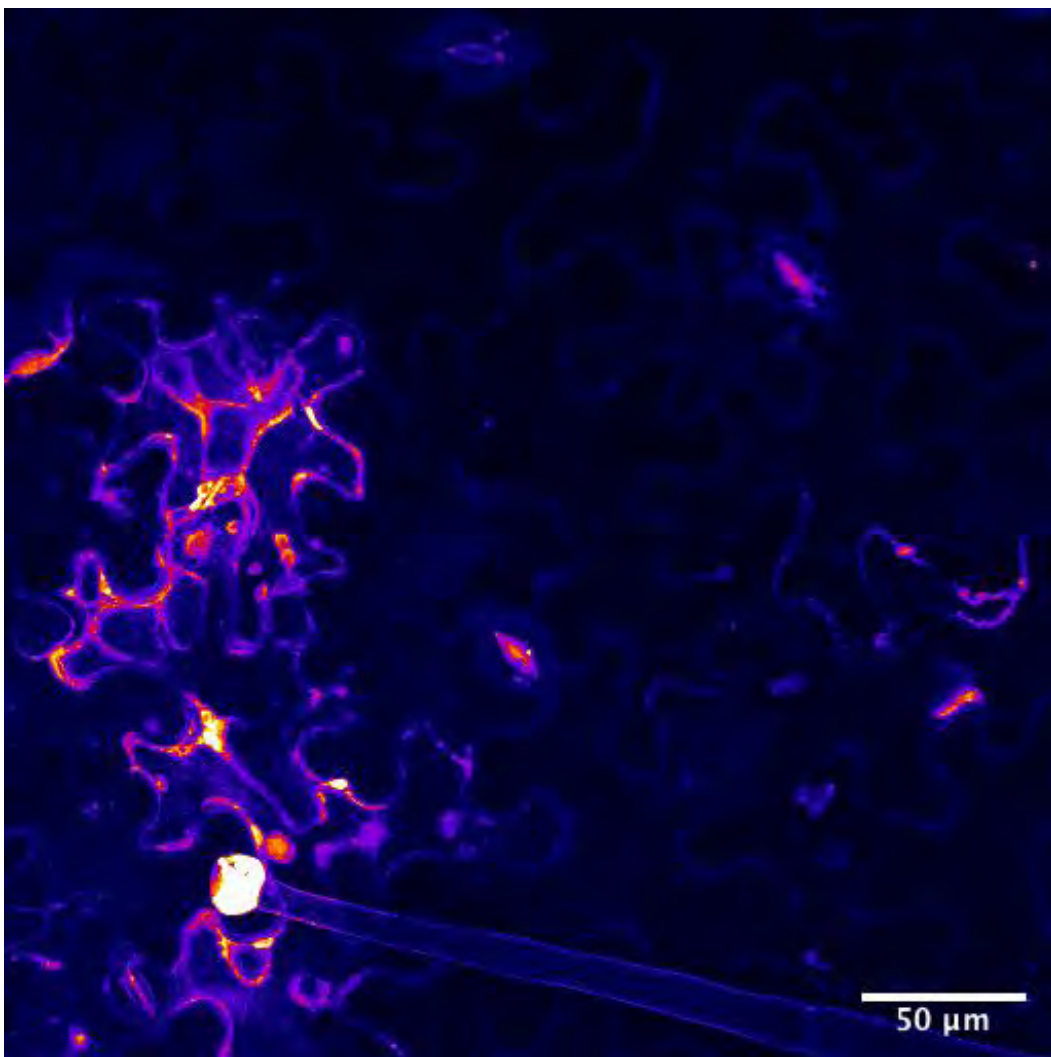


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Κατασκευή ενός μοριακού βιοαισθητήρα Förster Resonance Energy Transfer (FRET) για την *in vivo* ανίχνευση μεταβολιτών**

**Development of a modular Förster Resonance Energy Transfer (FRET) biosensor for high-throughput screening of metabolite binding domains**



**Πτυχιακή Εργασία**

**Νικόλαος Ντελκής (του Ευθυμίου)**

**Σεπτέμβριος 2020**



## Τριμελής Επιτροπή

**Καλλιόπη Παπαδοπούλου (επιβλέπουσα)**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

**Άννα-Μαρία Ψαρρά**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

**Αντώνης Γιακουντής**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής

**Εξώφυλλο:** Pavements cells φύλλων *Nicotiana benthamiana* WT, μετά από υπερέκφραση του βιοαισθητήρα γλυκόζης, κάτω από το συνεστιακό μικροσκόπιο (φωτογραφία z-stack) όπου οπτικοποιείται το φαινόμενο FRET, Ιούνιος 2020.



## Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να αναγνωρίσω τη συμβολή των ανθρώπων που υπήρξαν παράγοντες, άμεσοι ή έμμεσοι, στην επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην επιβλέπουσα μου, κυρία Καλλιόπη Παπαδοπούλου, η οποία έδειξε αμέριστη εμπιστοσύνη και προσπάθησε με κάθε τρόπο να «καθαρίσει το δρόμο» ώστε η πτυχιακή αυτή να φτάσει στο τέλος της. Ήταν εκεί όταν τη χρειάστηκα, γεμάτη συμβουλές, ιδέες και όρεξη για βοήθεια. Κυρίως όμως, ήταν αυτή που με έκανε μέσα από τα μαθήματά της να δω τα φυτά με άλλη ματιά, κάτι που θεωρώ είναι το σημαντικότερο όλων. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Γιακουντή και την κυρία Ψαρρά, που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή επιτροπή.

Ο ήρωας που δρα από τα παρασκήνια, αυτός που με καθοδηγούσε καθημερινά και ήταν εκεί για κάθε (ασήμαντη και προφανή) απορία μου, που ανέχτηκε τα χαζά λάθη που έκανα και βοήθησε στο να δω την ερευνητική διαδικασία με μία πιο κριτική ματιά, είναι ο μέντοράς μου Δρ. Κωνσταντίνος Γκαραγκούνης. Ελπίζω να μπορέσω κάποια στιγμή να επιστρέψω πολλαπλάσια τη γνώση και σοφία που μου έδωσε.

Η έρευνα είναι ομαδική και όχι ατομική, και το να βρίσκεται κανείς σε μία καλοδιάθετη και μεγάλη ομάδα είναι συναρπαστικό. Είμαι πολύ χαρούμενος που είμαι μέλος του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος, και θέλω να ευχαριστήσω το καθένα από τα παιδιά του εργαστηρίου ξεχωριστά, για τις μικρές ή μεγάλες συζητήσεις, συμβουλές και κάθε λογής αλληλεπίδραση που με βοηθούν να γίνω καλύτερος, εντός και εκτός του εργαστηρίου.

Τέλος, τη δυνατότητα να φτάσω ως εδώ μου την έχει δώσει η οικογένεια μου, προς την οποία δεν νομίζω πως μπορώ με λόγια να περιγράψω την ευγνωμοσύνη που νιώθω και προσπαθώ καθημερινά να ανταποδίδω με σκληρή δουλειά. Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω το νονό μου Νίκο Σκοπελίτη, διότι υποψιάζομαι πως με το λάδι που με έβαλε, μου μετέδωσε και την περιέργειά του για τον κόσμο και την ευχαρίστηση της ανακάλυψης και της ενδεδειγμένης έρευνας. Δεν θα βρίσκεται στην παρουσίαση αυτής της εργασίας, όμως είμαι σίγουρος πως θα ήταν περήφανος.



## Contents

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη.....  | 6  |
| Abstract .....   | 7  |
| Εισαγωγή .....   | 7  |
| Ανίχνευση μεταβολιτών σε φυτά.....   | 7  |
| Συνθετική Βιολογία .....   | 8  |
| Τι είναι Συνθετική Βιολογία;.....  | 8  |
| Εφαρμόζοντας τις αρχές της μηχανικής στη Βιολογία.....                           | 9  |
| Ο κύκλος Design-Build-Test-Learn (DBLT) .....                                    | 12 |
| Πλασμίδια Standard European Vector Architecture (SEVA).....                      | 12 |
| Συνθετική Βιολογία στα Φυτά (Plant Synthetic Biology).....                       | 12 |
| Προηγμένες τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης.....                                   | 13 |
| Τεχνολογία Golden Gate.....  | 14 |
| Τεχνολογία GoldenBraid.....  | 15 |
| Τεχνικές ταχείας σάρωσης (High-throughput screening).....                        | 15 |
| Förster Resonance Energy Transfer (FRET).....                                    | 16 |
| Σκοπός Εργασίας.....   | 20 |
| Υλικά & Μέθοδοι .....  | 20 |
| Σχεδιασμός τμημάτων DNA προς σύνθεση.....  | 20 |
| Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων υψηλής απόδοσης .....                             | 21 |
| Κλωνοποίηση κατασκευών με ένζυμα περιορισμού <i>Tyrell</i> S.....                | 21 |
| Domestication PCR των γενετικών τμημάτων .....                                   | 21 |
| One-pot dig-lig .....  | 22 |
| Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα <i>E. coli</i> DH5α.....                      | 22 |
| Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα <i>E. coli</i> DH5α.....                        | 22 |
| Επαλήθευση κατασκευής .....  | 22 |
| Κλωνοποίηση κατασκευών στον pGEX-6P1 .....                                       | 22 |
| Μετασχηματισμός <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 με ηλεκτροδιάτρηση ..... | 23 |
| Παροδική έκφραση σε φύλλα <i>Nicotiana benthamiana</i> .....                     | 24 |
| Συνεστιακή μικροσκοπία για οπτικοποίηση FRET .....                               | 24 |
| Μέτρηση φθορισμού σε plate-reader .....  | 25 |
| Αποτελέσματα .....   | 25 |
| Κατασκευή του bio-part δέκτη FRET (FRET Acceptor) .....                          | 25 |
| Κατασκευή πρότυπων βιοαισθητήρων FRET με τη χρήση του FRET Acceptor .....        | 28 |
| Γλυκόζη.....   | 28 |



|  |    |
|--|----|
| Λουπεόλη.....  | 29 |
| Επιβεβαίωση έκφρασης των βιοαισθητήρων FRET σε φυτά .....        | 31 |
| Γλυκόζη .....  | 31 |
| Λουπεόλη.....  | 32 |
| Βακτηριακή έκφραση, απομόνωση και μελέτη των βιοαισθητήρων ..... | 32 |
| Συναρμολόγηση κατασκευών μαρτύρων (controls).....                | 35 |
| Συζήτηση .....   | 36 |
| Βιβλιογραφία.....  | 39 |

## Περίληψη

Τα φυτά παράγουν ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών, με πιθανές φαρμακευτικές και εμπορικές εφαρμογές. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν κεντρικό ρόλο στη μοριακή σηματοδότηση στα φυτά, όμως πολλοί μηχανισμοί δράσεις τους δεν έχουν εξιχνιαστεί. Οι βιοαισθητήρες από φθορίζουσες πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν σε αυτό το ζήτημα, προσφέροντας ακριβείς χωροχρονικές πληροφορίες για τη συσσώρευση των επιθυμητών μεταβολιτών, με υψηλή υποκυτταρική ανάλυση. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει μία εργαλειοθήκη από τυποποιημένους βιοαισθητήρες μεταβολιτών. Σε αυτή την εργασία, αναπτύξαμε μία πλατφόρμα για την ταχεία σάρωση επικρατειών πρόσδεσης μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας ένα τυποποιημένο δέκτη Förster Resonance Energy Transfer (FRET) για την κατασκευή εξειδικευμένων βιοαισθητήρων. Διεξήχθη ανάλυση *in silico* για την ανίχνευση υποψήφιων πρωτεϊνικών επικρατειών, χρησιμοποιώντας το τριτερπένιο λουπεόλη ως δοκιμαστικό μόριο. Η κατασκευή βιοαισθητήρων με τη χρήση του δέκτη που αναπτύξαμε έχει ελάχιστο χρόνο κατασκευής τριών ημερών, ενώ τα πρωτόκολλα που παρέχουμε είναι πλήρως δεκτικά σε αυτοματοποίηση και συμβατά με προηγμένες τεχνικές κλωνοποίησης. Μελέτες *in vivo* και *in vitro* έγιναν για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας, εξειδίκευσης και ευαισθησίας των βιοαισθητήρων. Εκτός από την παροχή πληροφοριών υψηλής ακριβείας για τις δράσεις εξειδικευμένων μεταβολικών μονοπατιών σε φυτά, ελπίζουμε η πλατφόρμα να βοηθήσει σε περαιτέρω τυποποίηση και υιοθέτηση των υπόλοιπων αρχών της Συνθετικής Βιολογίας από την κοινότητα της Βιολογίας Φυτών.

## Abstract

Plants naturally produce a wide variety of metabolites with potential pharmaceutical and commercial applications by fixing inorganic carbon from the atmosphere. Secondary metabolites play a central role in plant signaling, but the mechanisms of action are still to be elucidated. Fluorescent-based biosensors can aid in this issue, by providing precise spatiotemporal information on the accumulation of any desired metabolite with subcellular resolution. However, a toolkit of standardized metabolite biosensors is not yet available. Here, we have developed a platform for high-throughput screening of metabolite binding domains, utilizing a standardized Förster Resonance Energy Transfer (FRET) biosensor acceptor. An *in silico* analysis was conducted to identify potential candidates for the biosensor binding domain, using the triterpene lupeol as the test-molecule of choice. Biosensor construction using our FRET Acceptor has a turnover of three days, while protocols are fully automatable and compatible with modular cloning techniques. *In vitro* and *in vivo* assays were conducted to determine biosensor functionality, specificity, and sensitivity. In addition to providing precise information on specialized biosynthetic pathway activities in plants, we aspire that our platform facilitates standardization and the endorsement of other Synthetic Biology principles within the Plant Biology community.

## Εισαγωγή

Τα φυτά είναι παντού γύρω μας. Πλημμυρίζουν την καθημερινότητά μας, σε ζωντανή ή μη μορφή, χάρη στην ικανότητά τους να καθηλώνουν τον άνθρακα της ατμόσφαιρας [1]. Ο άνθρακας αυτός χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, και για την παραγωγή ενός τεράστιου εύρους μεταβολιτών, πολλοί εκ των οποίων με φαρμακευτικές ιδιότητες [2]. Παρ' όλα αυτά, δεν γνωρίζουμε τα πάντα για τη λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο. Αυτή η εργασία στοχεύει στην κατασκευή εργαλείων για την παρατήρηση της χωροχρονικής συσσώρευσης εξειδικευμένων μεταβολιτών και μικρών μορίων με υποκυτταρική ανάλυση, χρησιμοποιώντας τις αρχές της Συνθετικής Βιολογίας, με απώτερο σκοπό την εξιχνίαση των πολύπλοκων φυτικών συστημάτων. Είναι όμως σημαντικό να ανιχνεύσουμε μεταβολίτες; Τι είναι Συνθετική Βιολογία και πως συμπληρώνει τη Μοριακή Βιολογία; Πως κατασκευάζουμε τέτοια εργαλεία οπτικοποίησης μορίων;

## Ανίχνευση μεταβολιτών σε φυτά

Η χρήση φυσικών προϊόντων με θεραπευτικές ή άλλες ωφέλιμες ιδιότητες χρονολογείται με την απαρχή της ανθρωπότητας. Οι πηγές που χρησιμοποιούσαν οι άνθρωποι ήταν, μεταξύ άλλων, τα φυτά [2]. Τα φυτά παράγουν μία τεράστια ποικιλία οργανικών μορίων, τα οποία δεν έχουν άμεση λειτουργία στην ανάπτυξη και ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες [3]. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες χωρίζονται με βάση τη δομή τους σε 3 κύριες κατηγορίες: 1) τερπένια και τερπενοειδή, 2) αλκαλοειδή και 3) φαινολικές ενώσεις [4].



Οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν επίσης κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση των φυτών (π.χ. φυτορμόνες), ενώ εμπλέκονται στη ρύθμιση μονοπατιών (σηματοδοτικών και βιοσυνθετικών) [5,6]. Αρκετοί μεταβολίτες παράγονται και δρουν σε πολύ συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους [7,8]. Ακόμη, για να κατανοήσουμε πως η φυσιολογία και η ανάπτυξη του φυτού συνδέονται, χρειαζόμαστε μεθόδους άμεσης μέτρησης θρεπτικών στοιχείων, μεταβολιτών και σηματοδοτικών μορίων, *in vivo* σε επίπεδο ιστών και μεμονωμένων κυττάρων [9].

Ένα από τα βασικά βήματα για τη μελέτη φυτικών μεταβολιτών, είναι η ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους στους φυτικούς ιστούς, ύστερα από εξαγωγή. Η εξαγωγή των μεταβολιτών γίνεται με μία πλειάδα μεθόδων, όπως η απόσταξη, η υποβολή σε μηχανικό stress, με χρήση υπερήχων (Ultrasound-wave) κ.α. [10,11]. Οι τεχνικές αυτές προϋποθέτουν άλεση και ομογενοποίηση του ιστού [12]. Σήμερα χρησιμοποιούνται αναλυτικά συστήματα χρωματογραφίας, όπως συστήματα GC- και LC-MS για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό δευτερογενών μεταβολιτών και του μεταβολικού προτύπου που υπάρχουν σε φυτικούς ιστούς. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για το χωρικό διαχωρισμό των μορίων σε υποκυτταρικό ή κυτταρικό επίπεδο [13,14].

Ένας εναλλακτικός τρόπος μελέτης των φυτικών μεταβολιτών, είναι η χρήση μοριακών βιοαισθητήρων (biosensors) για οπτικοποίηση της συσσώρευσης μορίων *in vivo*. Τέτοιοι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν φθορίζουσες πρωτεΐνες (GFP) για να ανιχνεύσουν στοιχεία όπως pH [15], ασβέστιο [16], ROS [17], ATP [18], φωσφατιδικό οξύ [19] ή ορμόνες (αμψισικό οξύ [20], αυξίνη [21]). Η ανάλυση των βιοαισθητήρων επιτρέπει τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την οπτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο [22].

Ενώ τέτοιοι βιοαισθητήρες έχουν αρκετά πλεονεκτήματα στη χρήση τους [23], η κατασκευή τους αποτελεί το κύριο εμπόδιο στην επέκταση σε άλλα, λιγότερο μελετημένα μόρια όπως εξειδικευμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτό συμβαίνει διότι κάθε βιοαισθητήρας μέχρι σήμερα, κατασκευάζεται για να εξυπηρετήσει συγκεκριμένες ερευνητικές ανάγκες, συνήθως από μεμονωμένες προσπάθειες, , κάτι που ωστόσο αυξάνει τόσο το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση του πειράματος, όσο και το κόστος.

## Συνθετική Βιολογία

### Τι είναι Συνθετική Βιολογία;

Η Συνθετική Βιολογία είναι μία νέα εφαρμοσμένη επιστήμη, η οποία προσαρμόζει τις αρχές της μηχανικής σε ένα βιολογικό πλαίσιο και έχει ως απώτερο σκοπό την τυποποίηση της βιολογίας και την επιτάχυνση της πειραματικής διαδικασίας. Γενικοί (και ίσως ενδεικτικοί) στόχοι της προσέγγισης αυτής είναι 1) ο σχεδιασμός και η κατασκευή νέων βιολογικών «μερών», «συσκευών» και «συστημάτων», 2) η τροποποίηση και επανασχεδιασμός υπαρχόντων οργανισμών ώστε να φέρουν χρήσιμα και επιθυμητά χαρακτηριστικά και 3) η δημιουργία νέων συνθετικών συστημάτων και οργανισμών [24,25].



## Εφαρμόζοντας τις αρχές της μηχανικής στη Βιολογία

Αν όχι ο σημαντικότερος, ένας κεντρικός πυλώνας της Συνθετικής Βιολογίας, είναι η Μηχανική και η αρχές της. Γιατί όμως τα στοιχεία της μηχανικής είναι τόσο χρήσιμα για ένα Συνθετικό Βιολόγο; Οι μηχανικοί έχουν την τάση να προσεγγίζουν ένα πρόβλημα με πολύ διαφορετικό τρόπο από ότι οι βιολόγοι. Δουλεύουν συστηματικά, μεθοδικά και εξαντλητικά, ακολουθώντας τα ίδια πρότυπα και χρησιμοποιώντας τυποποιημένα συστήματα κι εργαλεία. Μία τέτοια προσέγγιση, αν και επιθυμητή από τους βιολόγους, δεν είναι πάντα εφικτή και εφαρμόσιμη σε ένα βιολογικό σύστημα [26].

Αυτό συμβαίνει, αφενός γιατί η πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων είναι μεγαλύτερη από αυτή των κατασκευασμένων ηλεκτρονικών/μηχανικών συστημάτων, αφετέρου γιατί οι βιολόγοι στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν την πλήρη εικόνα του συστήματος. Αντιθέτως, οι μηχανικοί την έχουν, διότι αυτοί τη σχεδίασαν. Στη Συνθετική Βιολογία, τι μπορούμε λοιπόν να κληρονομήσουμε από αυτό το σκεπτικό;

Είμαστε μακριά από το να έχουμε πλήρη εικόνα για τα βιολογικά συστήματα. Αυτό που μπορούμε όμως να αλλάξουμε είναι ο τρόπος που τα προσεγγίζουμε και τα μελετάμε. Σε αυτό βοηθούν οι αρχές της μηχανικής, όπως η *τυποποίηση*, η *συνδυαστικότητα*, η *αποσύνδεση/αποσύζευξη* και η *αφαιρετική ιεραρχία*. Υπό αυτή την οπτική, ίσως είναι ευκολότερο η βιολογία να κατανοηθεί και να τροποποιηθεί κατά βούληση. Άλλο ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο, που θα αναλυθεί παρακάτω, είναι και ο κύκλος Σχεδιασμού-Κατασκευής-Δοκιμής-Μάθησης (Design-Build-Test-Learn cycle, DBTL).

### **Τυποποίηση (Standardization)**

Η τυποποίηση είναι από τις βασικότερες αρχές της μηχανικής, όπως επίσης και ένας γενικότερος πυλώνας της σύγχρονης ζωής. Είτε αυτό είναι οι βίδες που συναρμολογούμε τα έπιπλα μας, η ηλεκτρολόγηση μίας ηλεκτρονικής διεύθυνσης μίας ιστοσελίδας στο διαδίκτυο, ή η μέτρηση βάρους, αποστάσεων, θερμοκρασίας ή χρόνου: πρότυπα, κανόνες και συμφωνίες έχουν συναφθεί από την παγκόσμια κοινότητα. Τα πρότυπα (standards) υπάρχουν παντού γύρω μας, είτε τα βλέπουμε είτε όχι [27].

Στη Βιολογία, αρκετά πρότυπα έχουν ήδη θεσπιστεί, όπως η τυποποιημένη επεξεργασία δεδομένων (sequencing, microarrays, δεδομένα κρυσταλλογραφίας) και η ονοματολογία και κατηγοριοποίηση των ενζύμων [28] (IUBMB, cite <https://iubmb.org/biochemical-nomenclature/>). Παρόλ' αυτά, σε θέματα που αγγίζουν τη βιολογική μηχανική, η κοινότητα δεν έχει θεσπίσει ακόμη παγκόσμια πρότυπα [29]. Τέτοια πρότυπα, τα οποία πρέπει ν' αναπτυχθούν, αφορούν τις βασικές βιολογικές λειτουργίες (όπως η ισχύς ενός ιδιοσυστατικού υποκινητή ή η έκφραση υποβάθρου ενός επαγόμενου υποκινητή), πειραματικές μετρήσεις (όπως η συγκέντρωση πρωτεΐνης), καθώς και άλλες σημαντικές παράμετροι της πειραματικής διαδικασίας (για παράδειγμα το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού, θρεπτικό υλικό, ρυθμός ανάπτυξης, περιβαλλοντικές συνθήκες κλπ).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Συνθετική Βιολογία στοχεύει στην κατασκευή νέων βιολογικών «τμημάτων», «συσκευών» και συστημάτων. Οι κατασκευές αυτές συνδυάζονται μεταξύ τους για να δώσουν πολύπλοκους φαινοτύπους. Αυτό βασίζεται στη διασύνδεση

μεταξύ αλληλουχίας DNA και τελικής λειτουργίας. Για να πετύχει αυτό, χρειάζονται τρόποι καταγραφής των λειτουργιών κάθε επιμέρους τμήματος, ώστε συνδυάζοντας τα να μπορεί να προβλεφθεί και η τελική λειτουργία μίας πολυπλοκότερης κατασκευής [30]. Με την τυποποίηση τόσο διαδικασιών όσο και γενετικών τμημάτων, ένας μεγάλος φόρτος, κόστους και έργου, θα έχει γίνει ήδη από άλλους ερευνητές.

### *Συνδυαστικότητα (Modularity)*

Η συνδυαστικότητα (modularity) αντικατοπτρίζει το βαθμό στον οποίο τα τμήματα (modules) ενός συστήματος μπορούν να διαχωριστούν και να επαναχρησιμοποιηθούν [31]. Τα τμήματα είναι κατασκευασμένα από μέρη, τα οποία τελικά δίνουν στο κάθε τμήμα μία ξεχωριστή λειτουργία. Μέσα σε ένα σύστημα, κάθε τμήμα είναι *λειτουργικά και δομικά ξεχωριστό*, όμως όλα τα τμήματα *λειτουργούν συνδυαστικά* ώστε το σύστημα να λειτουργεί. Η σύνδεση μεταξύ των τμημάτων γίνεται σε *ένα* σημείο και μόνο, κάνοντας το σύστημα *ορθογωνικό*.

Η ορθογωνικότητα, ένας όρος δανεισμένος από τα μαθηματικά και την επιστήμη των υπολογιστών, είναι η λειτουργική ανεξαρτησία μεταξύ των κατασκευών που εισάγουμε σε έναν οργανισμό, και του μεταβολισμού/ των φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού αυτού. Αυτό σημαίνει πως μία γονιδιακή κατασκευή (πχ υποκινητής-κωδική αλληλουχία-τερματιστής) έχει πάντα την ίδια λειτουργία και δίνει πάντα το ίδιο αποτέλεσμα, *ανεξάρτητα* από τον οργανισμό που την εισάγουμε. Φυσικά, ενώ αυτό ισχύει σε ένα βαθμό για κατασκευές όπως αυτές που περιέχουν GFP ή άλλα φθορίζοντα μόρια, η πολυπλοκότητα και στοχαστικότητα των μεταβολικών δικτύων των οργανισμών παρουσιάζουν δυσκολίες στην πλήρη εφαρμογή αυτού του όρου μέχρι σήμερα [32,33].

Η έννοια αυτή φέρνει στο προσκήνιο και άλλη μία προσέγγιση: ένα πολύπλοκο σύστημα μπορεί να μοιραστεί σε επιμέρους τμήματα τα οποία μελετώνται μεμονωμένα, κάνοντας τη διαχείριση του πιο εύκολη [31]. Αυτό συνδυάζει την συνδυαστικότητα με την αφαιρετική ιεραρχία που θα αναλυθεί παρακάτω. Ουσιαστικά, αν θεωρήσουμε κάθε τμήμα που επιτελεί μία λειτουργία ως «μαύρο κουτί», που λαμβάνει μία πληροφορία και μας δίνει ένα αποτέλεσμα, μπορούμε να δούμε το σύστημα στο σύνολο του, χωρίς να βυθιστούμε στις τεχνικές λεπτομέρειες του κάθε υποσυστήματος.

Το σκεπτικό αυτό εφαρμόζεται πλέον και σε βιολογικά συστήματα. Τέτοια τμήματα μπορεί να είναι γενετικά κυκλώματα [34] ή ακόμη και ολόκληρα μεταβολικά μονοπάτια [35]. Για παράδειγμα, οι *Qin et al., 2015* χώρισαν το μονοπάτι βιοσύνθεσης της L- ορνιθίνης σε 3 επιμέρους λειτουργικές μονάδες, με βάση τη λειτουργία και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των επιμέρους ενζύμων, ώστε να αυξήσουν την απόδοση παραγωγής L-ορνιθίνης σε κύτταρα ζύμης, όταν αυτά τρέφονται με γλυκόζη.

### *Αποσύνδεση (Decoupling)*

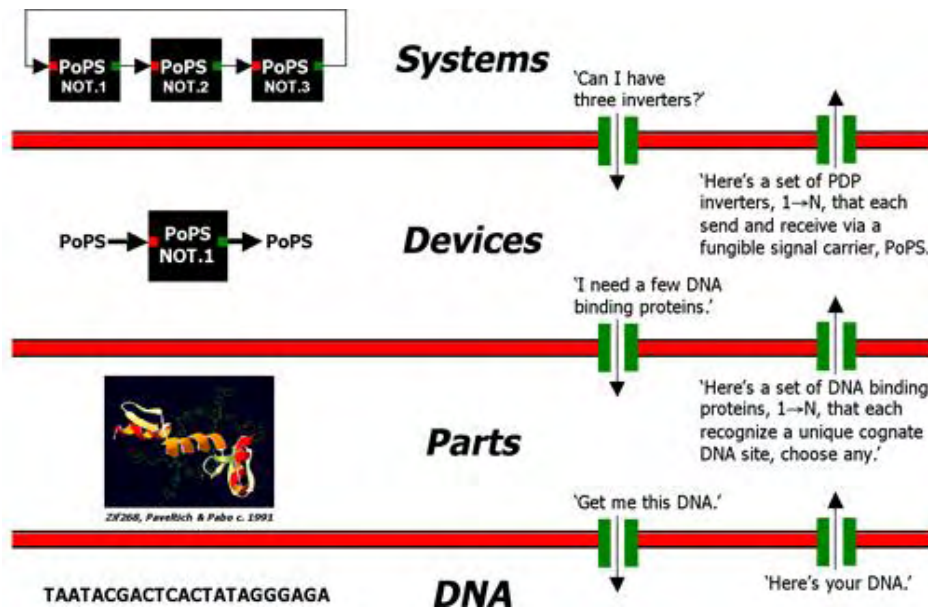
Η έννοια της αποσύνδεσης (του decoupling) συνδέεται άμεσα με την συνδυαστικότητα ενός συστήματος. Ουσιαστικά, ένα συνδυαστικό σύστημα είναι δυνατόν να αποσυνδεθεί (διαχωριστεί) στα επιμέρους τμήματα του, να κατασκευαστεί και δοκιμαστεί ως ξεχωριστά τμήματα, , ενώ τα αποτελέσματα από κάθε ξεχωριστό τμήμα είναι δυνατόν να

αναχθούν στο επίπεδο του συστήματος [36]. Αυτό βοηθάει κατά μεγάλο βαθμό στη μείωση της πολυπλοκότητας, καθώς και επιταχύνει την ερευνητική διαδικασία.

Αυτό το όραμα έρχεται με μικρά βήματα στην πραγματικότητα. Σε αντιπαράθεση με τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα χυτήρια (foundries) στις βαριές βιομηχανίες, έχουν δημιουργηθεί *biofoundries* [37], τα οποία αντ' αυτού κατασκευάζουν πολύπλοκα γενετικά συστήματα ή συνθετικά γονιδιώματα. Ο σκοπός των *biofoundries*, είναι τόσο η επιτάχυνση της τετριμμένης εργασίας στον πάγκο, όσο και η απλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας με αυξημένη επαναληψιμότητα (όπως βλέπουμε σε κοινά εργοστάσια) μέσω χρήσης αυτοματοποιημένων συστημάτων. Τέτοια παραδείγματα *biofoundries* [29] είναι το [Edinburgh Genome Foundry](#), όπως και το [London Biofoundry](#).

### Αφαιρετική Ιεραρχία (Abstraction hierarchy)

Τέλος, μία έννοια πολύ χρήσιμη για τη μηχανική και κατ' επέκταση για τη Συνθετική Βιολογία, είναι η αφαιρετική ιεραρχία. Η αφαιρετική ιεραρχία περιγράφει το διαχωρισμό των τμημάτων ενός συστήματος σε επίπεδα (levels) ανάλογα με την πολυπλοκότητά τους. Ο σκοπός της έννοιας αυτής είναι να αποκρύψει περιττές λεπτομέρειες και να διαχειριστεί την πολυπλοκότητα [36]. Η ιδέα της Συνθετικής Βιολογίας είναι ενσωματωμένη σε αυτή την έννοια, μιας και κεντρικός στόχος του πεδίου είναι η κατασκευή μερών, συσκευών και συστημάτων. Αυτές οι τρεις κατηγορίες, αντιπροσωπεύουν και διαφορετικά επίπεδα πολυπλοκότητας. Ανάμεσα σε κάθε επίπεδο, δεν ανταλλάσσονται οι πλήρεις λεπτομέρειες κατασκευής για τα στοιχεία του επιπέδου, παρά μόνο οι απαραίτητες πληροφορίες για τη σωστή λειτουργία στο επόμενο επίπεδο. Ένα παράδειγμα φαίνεται στο Διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Παρουσίαση της αφαιρετικής ιεραρχίας, όπως αυτή εφαρμόζεται σε βιολογικά συστήματα και κυρίως στο DNA τους. Πηγή: [parts.igem.org](http://parts.igem.org)

## Ο κύκλος Design-Build-Test-Learn (DBLT)

Μετά τις αρχές της μηχανικής, το εργαλείο που έχει επιταχύνει όλες τις τεχνολογικές επαναλήψεις της ανθρωπότητας είναι ο κύκλος DBLT. Είναι μία τόσο απλή ιδέα, που θα τη θεωρούσε κανείς περιττή αναφοράς, όταν όμως εφαρμοστεί πειθαρχημένα και για αρκετό καιρό, μπορεί να αποφέρει τεράστια άλματα στην τεχνολογία [38].

Το απλό σκεπτικό είναι το εξής: Για να κατασκευαστεί οτιδήποτε λειτουργικό, υπάρχουν 4 στάδια: 1) Σχεδιασμός/Μοντελοποίηση του συστήματος 2) κατασκευή του συστήματος με βάση το σχέδιο/μοντέλο 3) Δοκιμή του συστήματος και σύγκριση με το μοντέλο 4) Συλλογή πληροφοριών και χρήση τους ώστε το σχέδιο μοντέλο να βελτιωθεί [39].

Ας αναλογιστούμε ξανά το παράδειγμα της L-ορνιθίνης. Τα κύτταρα ζύμης που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές σε αυτό το πείραμα, παράγουν φυσιολογικά περίπου 10 mg L<sup>-1</sup> ορνιθίνης ανά λίτρο θρεπτικού καλλιέργειας. Μετά από αλληπάλληλο σχεδιασμό, κατασκευή νέων στελεχών, δοκιμή των στελεχών και ανασχεδιασμό της στρατηγικής, η τελική απόδοση παραγωγής του συστήματος ήταν 1.041 mg L<sup>-1</sup> ορνιθίνης ανά λίτρο θρεπτικού καλλιέργειας. Αυτό έγινε μετά από 34 κύκλους DBLT, το οποίο δείχνει πόσο σημαντικά αποτελέσματα μπορεί να πετύχει κανείς αν χρησιμοποιεί πιστά αυτό το εργαλείο [35].

## Πλασμίδια Standard European Vector Architecture (SEVA)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η τυποποίηση είναι υψίστης σημασίας στην επιτυχία των στόχων της Συνθετικής Βιολογίας. Σήμερα, ενώ υπάρχουν βάσεις δεδομένων με χιλιάδες χαρακτηρισμένα τυποποιημένα βιολογικά μέρη και συσκευές [40], είναι πολύ σημαντικό η έκφραση αυτών των εφαρμογών να γίνεται με τον ίδιο τρόπο.

Ένα τέτοιο βήμα έχει γίνει με τα τυποποιημένα πλασμίδια SEVA (Standard European Vector Architecture) [41]. Τα πλασμίδια SEVA είναι κατασκευασμένα με τέτοιο τρόπο, ώστε τα βασικά τους τμήματα (ori, γονίδιο επιλογής, MCS/Cargo) να είναι εναλλάξιμα με οποιαδήποτε επιθυμούμε από μία τεράστια συλλογή. Αυτό σημαίνει πως μπορούμε να κατασκευάσουμε πλασμίδια με χαμηλό ή υψηλό αριθμό αντιγράφων, τα οποία θα έχουν ανθεκτικότητα σε όποιο αντιβιοτικό επιθυμούμε. Ακόμη, η [ιστοσελίδα](#) που υποστηρίζει την πλατφόρμα είναι εύκολη στη χρήση [42], ώστε να μπορεί ένας απλός χρήστης να βρίσκει το πλασμίδιο που χρειάζεται και να το παραγγέλνει, δωρεάν.

## Συνθετική Βιολογία στα Φυτά (Plant Synthetic Biology)

Τα φυτά είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, συνήθως με πολυπλοειδή γονιδιώματα, πολλά γονίδια για την ίδια λειτουργία, και ένα συναρπαστικό μα πολύπλοκο δίκτυο ρύθμισης, βιοσύνθεσης και αποδόμησης δευτερογενών μεταβολιτών. Οι συνήθεις πλατφόρμες Συνθετικής Βιολογίας μέχρι σήμερα, είναι κυρίως προκαρυώτες και απλοί ευκαρυώτες, όπως ζυμομύκητες. Γι' αυτό το λόγο, η μεταφορά των εργαλείων και τεχνολογιών στα φυτά γίνεται με πιο αργούς ρυθμούς. Παράλληλα, τα κενά που υπάρχουν σε αρκετά φυτικά μονοπάτια σε διάφορα επίπεδα, κάνουν την ορθογωνική ρύθμιση και την έκφραση μίας επιθυμητής λειτουργίας ακόμη πιο δύσκολη, αφού δεν έχουμε πλήρη εικόνα των συστημάτων αυτών και κινούμαστε στα τυφλά [43].

Έτσι, η Συνθετική Βιολογία στα φυτά (Plant Synthetic Biology) δεν έχει δείξει ακόμη το πλήρες δυναμικό της, ενώ αρκετά βήματα χρειάζονται ακόμη για να πετύχει αυτό. Ωστόσο, τα εργαλεία που προσφέρει η Συνθετική Βιολογία μπορεί να φανούν πολύ χρήσιμα για την τροποποίηση των φυτών με ρυθμούς πολύ ταχύτερους από ότι με τους κλασσικούς τρόπους τεχνητής επιλογής [44]. Υπάρχει επίσης η άποψη πως η φύση έχει εκμεταλλευτεί ένα πολύ μικρό μέρος από αυτό που είναι βιοχημικά εφικτό (design space) στο κομμάτι του μεταβολισμού, ενώ η Συνθετική Βιολογία μπορεί να βοηθήσει άμεσα στην εύρεση νέων τρόπων παραγωγής χρήσιμων προϊόντων [45-47]. Για να φτάσουμε όμως εκεί, χρειάζεται να γνωρίζουμε πρώτα το σύστημα το οποίο δουλεύουμε σε βάθος, κάτι το οποίο δεν μπορούμε να κάνουμε αν δεν βρούμε τα κομμάτια που λείπουν και τα χαρακτηρίσουμε [48].

Έχοντας λοιπόν τα κατάλληλα εργαλεία κατασκευής φυτικών συσκευών – τα οποία θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο – οι εφαρμογές της Συνθετικής Βιολογίας αφορούν την τροποποίηση ενδογενών σηματοδοτικών μονοπατιών, πρωτεϊνών, ή ακόμη και του μεταβολισμού προς όφελος του ανθρώπου [48]. Η κατασκευή βιοαισθητήρων για την ανίχνευση των ενδογενών στοιχείων αποτελεί βασικό στενωπό στην περαιτέρω διαλευκάνση των μονοπατιών [49].

## Προηγμένες τεχνικές μοριακής κλωνοποίησης

### Πρότυπα συναρμολόγησης (Assembly Standards) και εναλλαξιμότητα γενετικών τμημάτων με ένζυμα περιορισμού Type IIS

Ακολουθώντας τις αρχές της μηχανικής, η τυποποίηση γενετικών τμημάτων είναι μία κεντρική ιδέα της Συνθετικής Βιολογίας. Για να φτάσει όμως κανείς στην τυποποίηση, χρειάζεται πρώτα να σχεδιάσει και να κατασκευάσει τα κομμάτια DNA που επιθυμεί, με μία συγκεκριμένη σειρά. Υπάρχουν πολλές τεχνικές, όπως η κλασική μοριακή κλωνοποίηση με ένζυμα περιορισμού, τεχνολογίες που χρησιμοποιούν ρεκομπινάσες, όπως το Gateway® Cloning [50], τεχνολογίες ένωσης επικαλυπτόμενων τμημάτων (Gibson Assembly) [51], καθώς και τεχνολογίες που χρησιμοποιούν ένζυμα περιορισμού Type IIS [52,53]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τελευταία προσέγγιση, η οποία προσφέρει υψηλή ευελιξία.

Το πλεονέκτημα που προσφέρουν τα ένζυμα περιορισμού Type IIS, είναι το εξής: όταν αναγνωρίζουν μία αλληλουχία DNA, δεν πέπτουν την αλληλουχία στο ίδιο σημείο, αλλά στοχεύουν 4 γειτονικά νουκλεοτίδια, όποια κι αν είναι αυτά. Έτσι, από την πέψη με ένα τέτοιο ένζυμο, δημιουργούνται κολλώδη άκρα 5'NNNN3', τα οποία μπορούμε εμείς να προσδιορίσουμε προς όφελος μας και να ενώσουμε πολλά μέρη DNA με όποια σειρά επιθυμούμε, με ένα μόνο ένζυμο περιορισμού, σε μία αντίδραση ενός βήματος (one-pot, one-step reaction) [54]. Αυτό γίνεται με τα πρότυπα συναρμολόγησης (assembly standards), μία συμφωνία μεταξύ επιστημόνων για την τυποποιημένη κατασκευή γενετικών κυκλωμάτων [55,56]. Έτσι, έχοντας βιβλιοθήκες για κάθε μέρος DNA (πχ υποκινητή, κωδική αλληλουχία, τερματιστή) στις οποίες, ανάλογα με τη λειτουργία της αλληλουχίας, υπάρχει και η αντίστοιχη ετικέτα τεσσάρων νουκλεοτιδίων σε κάθε άκρο. Πράγμα που επιτρέπει την κατευθυνόμενη συναρμολόγηση και μοναδική σειρά ένθεσης των επιμέρους τμημάτων σ'



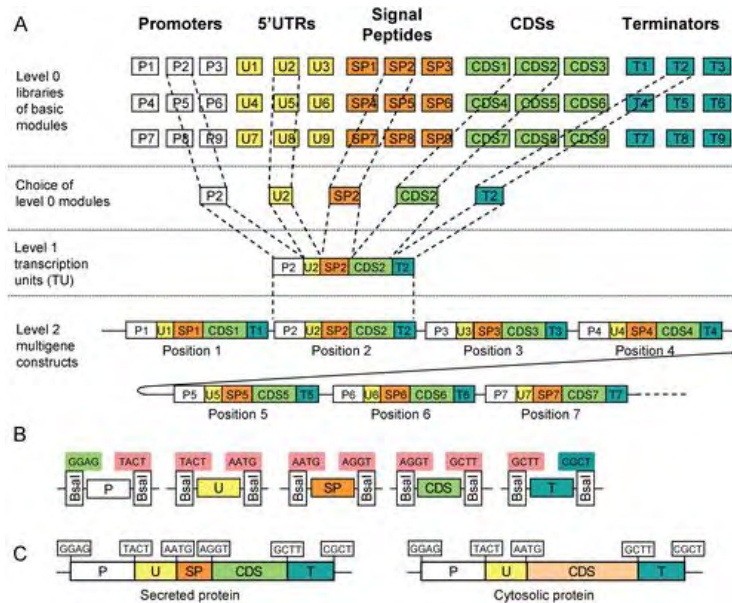
ένα βήμα. Δημιουργείται έτσι ένα «γενετικό συντακτικό», ώστε τα πρότυπα συναρμολόγησης να είναι κοινά σε όλη την επιστημονική κοινότητα.

Η ιδέα αυτή έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη δύο ξεχωριστών συστημάτων κλωνοποίησης, το Golden Gate και GoldenBraid, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και θα αναλυθούν συνοπτικά παρακάτω.

## Τεχνολογία Golden Gate

Το Golden Gate (GG) είναι ένα ιεραρχικό σύστημα μοριακής κλωνοποίησης που επιτρέπει την κατασκευή πολύπλοκων ευκαρυωτικών DNA κατασκευών από αρχικές βιβλιοθήκες χαρακτηρισμένων μερών [57]. Το σύστημα χρησιμοποιεί τα ένζυμα περιορισμού *Tyrells BsaI* και *Bpil* (*BbsI*), για να δημιουργήσει μεταγραφικές μονάδες και πολυγονδιακές κατασκευές, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω. Υπάρχουν 3 επίπεδα στην ιεραρχία:

1. Το Επίπεδο 0 (Level 0, L0), όπου υπάρχουν οι βιβλιοθήκες με τα χαρακτηρισμένα μέρη για κάθε θέση (κάθε μέρος [πχ υποκινητής, κωδική αλληλουχία] έχει διαφορετικό L0 φορέα)
2. Το Επίπεδο 1 (Level 1, L1), όπου τα επιλεγμένα κομμάτια L0 συναρμολογούνται σε ένα φορέα για την κατασκευή μίας μεταγραφικής μονάδας (Transcriptional Unit, TU)
3. Το Επίπεδο 2 (Level 2, L2) όπου τα L1 TUs συνδυάζονται σ' ένα νέα φορέα για την δημιουργία πολυγονδιακών κατασκευών.



**Διάγραμμα 2.** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κατασκευής βιβλιοθηκών και μεταγραφικών μονάδων με το MoClo [58].

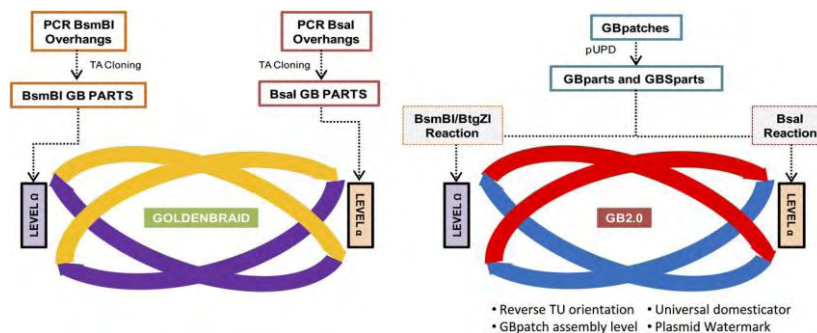
Πάνω στο σύστημα αυτό, έχει αναπτυχθεί μία γενετική «εργαλειοθήκη» για φυτά, η MoClo (Modular Cloning) [58], η οποία περιέχει τόσο έτοιμες κατασκευές, χαρακτηρισμένα αρχικά μέρη, όσο και πλασμιδιακούς φορείς για τη δημιουργία νέων κατασκευών και ένταξη (domestication) νέων μερών στο GG.

## Τεχνολογία GoldenBraid

Το GoldenBraid (GB) είναι ένα σύστημα συναρμολόγησης τμημάτων DNA, το οποίο βασίζεται επίσης σε ένζυμα περιορισμού *Tyrells* [52] και έχει αρκετές ομοιότητες με το Golden Gate. Για χάριν συντομίας, θα εστιάσουμε στις διαφορές των δύο συστημάτων.

Πρώτα, αξίζει να σημειωθεί πως το «γενετικό συντακτικό» μεταξύ των δύο προτύπων είναι ίδιο, το οποίο συνεπάγεται εναλλαγή μεταξύ των δύο, αν υπάρχουν οι κατάλληλοι φορείς. Το GB διαφέρει όμως ως προς την ιεραρχία της συναρμολόγησης, ενώ χρησιμοποιεί τα ένζυμα *BsaI* και *BsmBI* (*Esp3I*). Αντί να έχει πολλά επίπεδα και ξεχωριστούς φορείς ανά επίπεδο όπως το GG, η συναρμολόγηση GB έχει μία διάταξη «πλεξούδας» δύο επιπέδων, η οποία είναι η εξής:

1. Η αλληλουχία DNA της επιλογής μας εισέρχεται στο GB μέσω ενός universal domesticator φορέα (pUPD) με πέψη *BsmBI* [59]. Ο σχεδιασμός είναι τέτοιος, ώστε ανάλογα τη θέση που θέλουμε η αλληλουχία να έχει στην κατασκευή (πχ υποκινητής), τροποποιούμε την αλληλουχία του DNA που εισάγουμε (με overhang PCR) και όχι με χρήση διαφορετικών φορέων, δημιουργώντας ένα GBpart (αντίστοιχο του L0 στο GG).
2. Στη συνέχεια, με πέψη *BsaI* το κομμάτι DNA (GBpart) συναρμολογείται μαζί με άλλα GBparts σε έναν Level α φορέα. Σε αυτό το σημείο έχουμε L1 κατασκευή, αντίστοιχη του GG.
3. Δύο Level α κατασκευές συνδυάζονται με πέψη *BsmBI* πέψη για να συναρμολογηθούν σε έναν Level Ω φορέα, δημιουργώντας μία κατασκευή με 2 TUs.
4. Δύο Level Ω κατασκευές συνδυάζονται με πέψη *BsaI* για να συναρμολογηθούν σε έναν Level α φορέα, και αυτό συνεχίζεται όσο εμείς επιθυμούμε.



**Διάγραμμα 3.** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνολογίας GoldenBraid 2.0 [59].

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί, πως το GB έχει αναβαθμιστεί (τώρα πια GB4.0), έχοντας επίσης μία πλήρως λειτουργική [ιστοσελίδα](#), η οποία επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό νέων αλληλουχιών προς ένταξη στο GB σύστημα, ενώ περιέχει και βάση δεδομένων με ήδη υπάρχουσες χαρακτηρισμένες κατασκευές ειδικές για φυτά [60].

## Τεχνικές ταχείας σάρωσης (High-throughput screening)

Η κατασκευή και η δοκιμή των γενετικών συστημάτων που έχουμε σχεδιάσει, αποτελεί συνήθως το στενωπό στον κύκλο DBTL. Μία λύση είναι η αυτοματοποίηση της

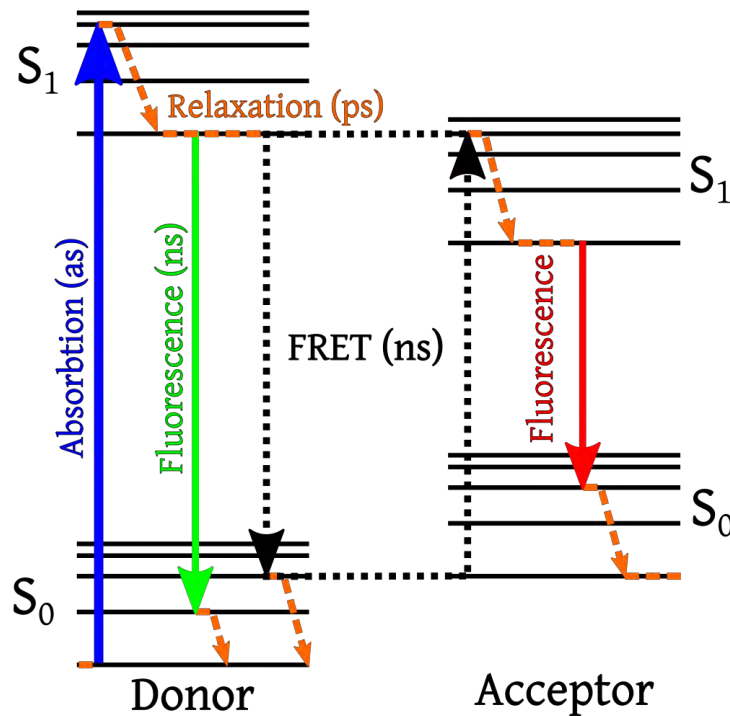


διαδικασίας τόσο στην κατασκευή όσο και στη δοκιμή, αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα, προβλεψιμότητα και επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Αυτό επιτυγχάνεται με τεχνικές ταχείας σάρωσης (high-throughput screening techniques). Η έννοια του high-throughput αντικατοπτρίζει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης μίας διαδικασίας για την αύξηση του αριθμού δειγμάτων που μελετάται κατά την πειραματική διαδικασία [61,62].

Ανάλογα με το πείραμα που εκτελούμε, το high-throughput screening έχει διαφορετικές όψεις. Στην κατασκευή ενός βιοαισθητήρα, που αφορά άμεσα την παρούσα εργασία, η εφαρμογή τέτοιων τεχνολογιών γίνεται σε δύο βήματα: 1) κατασκευή και δοκιμή πολλών βιοαισθητήρων με χρήση ρομποτικής τεχνολογίας, σε διάταξη 96 δειγμάτων (96-well plate format). Αυτό επιτρέπει την ένδειξη του ποιος σχεδιασμός δουλεύει καλύτερα. Εδώ η ικανότητα σάρωσης δεν είναι υψηλή (μέγιστο  $10^3$ - $10^4$  δοκιμές ανά ημέρα), το οποίο όμως επαρκεί. Αφού εντοπιστεί κάποιος υποσχόμενος βιοαισθητήρας, περνάμε στο 2) που αφορά τη βελτιστοποίηση του αισθητήρα, δημιουργώντας βιβλιοθήκες με μεταλλάγματα. Η σάρωση τώρα είναι πολύ πιο απαιτητική, γι' αυτό γίνεται χρήση ultrahigh-throughput τεχνικών, όπως Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) [63, ανασκόπηση της τεχνολογίας στην 66] ή droplet-based microfluidics [64]. Οι τεχνολογίες αυτές μπορούν να σαρώσουν  $10^6$ - $10^9$  μεταλλάγματα την ημέρα [65], το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση βελτιστοποιημένων βιοαισθητήρων.

## Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

Ο μηχανισμός Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer (FRET) περιγράφει τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ δύο φωτο-ευαίσθητων μορίων (φθορισμοφόρων) [67]. Τα δύο φθορισμοφόρα έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Το πρώτο φθορισμοφόρο ονομάζεται *δότης* (*donor*) και δέχεται ακτινοβολία ώστε τα ηλεκτρόνια του να είναι σε διεγερμένη κατάσταση. Η ενέργεια του δότη μεταφέρεται στο δεύτερο φθορισμοφόρο, το *δέκτη* (*acceptor*), όταν τα δύο αυτά μόρια βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους ( $<10$  Å) και σε σωστό προσανατολισμό και επηρεάζεται άμεσα από το ρυθμό μεταφοράς  $k_t$ , ο οποίος θα αναλυθεί παρακάτω. Η ενέργεια αυτή μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και να συσχετιστεί με την αλληλεπίδραση των μορίων, που είναι κεντρικό κομμάτι για τη δημιουργία ενός βιοαισθητήρα.



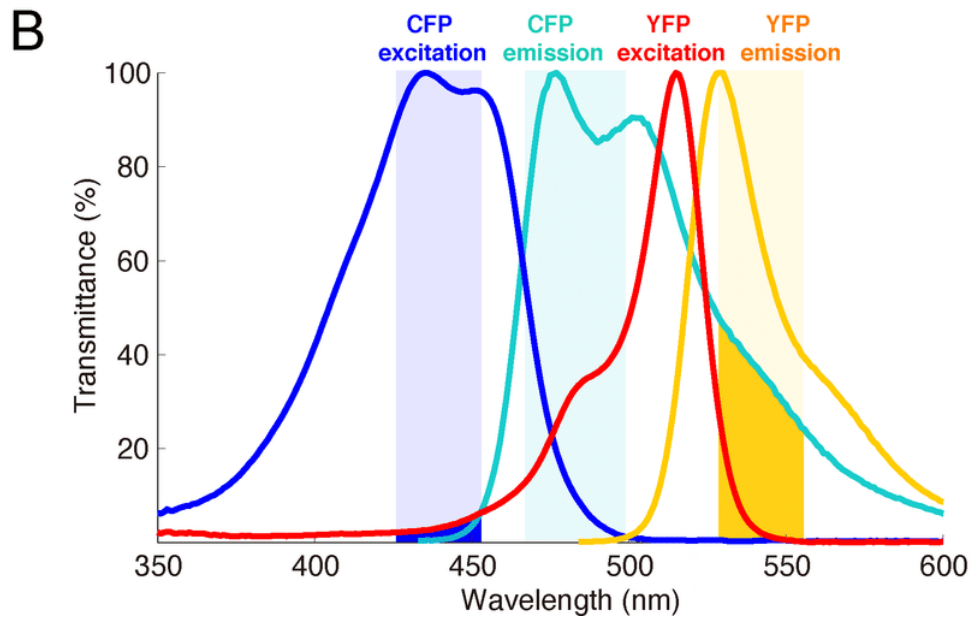
**Διάγραμμα 4.** Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου FRET, όσον αφορά τις ενεργειακές καταστάσεις των ηλεκτρονιακών στιβάδων.

Η ποσοτικοποίηση του φαινομένου FRET ξεκίνησε από τον Theodor Förster και περιγράφεται από την εξίσωση [16]:

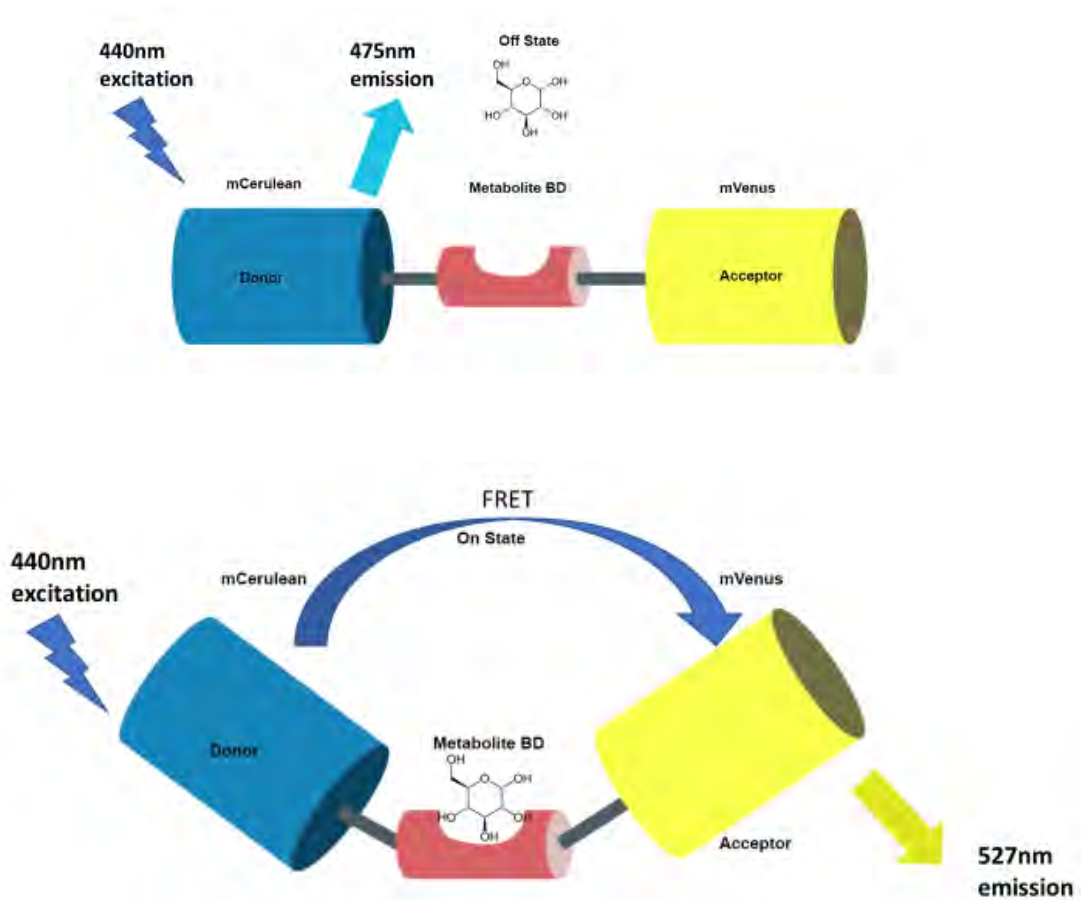
$$E = 1/(R/R_0)^6$$

όπου  $E$  η απόδοση μεταφοράς ενέργειας,  $R$  η απόσταση των δύο φθορισμοφόρων και  $R_0$  η σταθερά Förster, η οποία είναι η διαμοριακή απόσταση όπου το FRET έχει απόδοση 50% [68]. Η απόδοση τελικά εξαρτάται κυρίως από τρεις παράγοντες: την απόσταση μεταξύ των δύο φθορισμοφόρων, το σχετικό προσανατολισμό τη στιγμή της μεταφοράς, καθώς και την επικάλυψη μεταξύ των δύο φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής τους [69].

Στη Βιολογία, τα φθορισμοφόρα είναι συνήθως φθορίζουσες πρωτεΐνες, όπως η GFP [70] και οι παραλλαγές της (Fluorescent Proteins, FPs) [71]. Με τη δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών που εκμεταλλεύονται το φαινόμενο συντονισμού μεταξύ κατάλληλου δότη και δέκτη, μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα βιοαισθητήρα ανίχνευσης ενδογενών μικρών μορίων. Πιο συγκεκριμένα, αν τοποθετήσουμε μία επικράτεια πρόσδεσης ενός συγκεκριμένου μορίου ανάμεσα σε δύο FPs, όπου η μία είναι δότης και η άλλη δέκτης, έχουμε τη βάση για ένα πολύ ευαίσθητο βιοαισθητήρα. Η αλλαγή της στερεοχημικής διαμόρφωσης του βιοαισθητήρα αλλάζει μετά την πρόσδεση του μεταβολίτη [72], οπότε η απόδοση του FRET αλλάζει και μπορεί πλέον να μετρηθεί. Οι FPs επιλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής δότη και δέκτη να έχουν μία επικάλυψη, όπως φαίνεται παρακάτω.



**Διάγραμμα 5.** Αναπαράσταση των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης των CFP και YFP, που χρησιμοποιούνται σε ένα βιοαισθητήρα FRET. Για να λειτουργήσει ο βιοαισθητήρας, χρειάζεται να υπάρχει μικρή αλληλεπικάλυψη μεταξύ των φασμάτων εκπομπής των δύο πρωτεϊνών. Πηγή: Yamao M *et al.* (2016)



**Διάγραμμα 6.** Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού FRET, στις OFF και ON καταστάσεις.

Έτσι, για να κάνουμε την ποσοτικοποίηση, υπολογίζουμε την αναλογία του FRET. Η αναλογία υπολογίζεται ως εξής: Διεγείρουμε το βιοαισθητήρα στο μήκος κύματος απορρόφησης του δότη και στη συνέχεια μετρούμε την εκπομπή στα μήκη κύματος εκπομπής τόσο του δότη, όσο και του δέκτη. Όταν ο μεταβολίτης δεν υπάρχει, το σύστημα βρίσκεται σε συγκεκριμένη στερεοχημική διαμόρφωση, το φαινόμενο FRET είναι περιορισμένο (συμβαίνει με χαμηλή απόδοση), η απορρόφηση είναι *υψηλή* στο φάσμα εκπομπής του *δότη* και χαμηλή σε αυτό του δέκτη. Όταν ο μεταβολίτης υπάρχει και προσδεθεί στο βιοαισθητήρα, η στερεοχημική διαμόρφωση αλλάζει και η απόδοση FRET αυξάνεται. Έτσι η απορρόφηση είναι *υψηλή* στο φάσμα εκπομπής του *δέκτη* και χαμηλή σε αυτό του *δότη*. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίζοντας την αναλογία φάσμα<sub>δέκτη</sub> : φάσμα<sub>δότη</sub>, μπορούμε να αποφανθούμε για την ύπαρξη ή όχι του μεταβολίτη στο δείγμα που εξετάζουμε [73].

Το επόμενο βήμα για να φτάσουμε στην ποσοτικοποίηση, είναι η βαθμονόμηση (calibration) του αισθητήρα. Αυτό είναι μία δοκιμασία *in vitro* όπου προσθέτουμε γνωστές

συγκεντρώσεις του προσδέτη σε απομονωμένο βιοαισθητήρα και μετρούμε την αναλογία FRET που προκύπτει. Έτσι, δημιουργούμε μία πρότυπη καμπύλη, την οποία χρησιμοποιούμε για να ποσοτικοποιήσουμε τα δείγματα υπό εξέταση [74].

## Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κατασκευή ενός συνδυαστικού μοριακού βιοαισθητήρα FRET, για την ανίχνευση δευτερογενών μεταβολιτών. Εφαρμόζοντας τις αρχές της Συνθετικής Βιολογίας, όπως η χρήση τυποποιημένων βιομερών και πλασμιδίων, συνδυαστικών κατασκευών, καθώς και την ευελιξία και ορθή χρήση του κύκλου DBTL, θα προσπαθήσουμε να ξεπεράσουμε τα σημερινά τεχνολογικά τέλματα, ώστε να κατασκευάσουμε αισθητήρες εξειδικευμένων μεταβολιτών υψηλής υποκυτταρικής ευκρίνειας, με το ελάχιστο δυνατό κόστος.

Η εργασία χωρίζεται σε τρία μέρη. Πρώτα, έγινε ανακατασκευή ενός βιβλιογραφικά γνωστού βιοαισθητήρα FRET για τη γλυκόζη [74], χρησιμοποιώντας τις αρχές της Συνθετικής Βιολογίας. Το κομμάτι αυτό αποτελεί την απόδειξη επί της αρχής του συνδυαστικού αισθητήρα μας. Ουσιαστικά, δημιουργήσαμε μία κατασκευή δέκτη (acceptor), η οποία με τη χρήση προηγμένων τεχνικών κλωνοποίησης και κλασικών γονιδίων επιλογής (LacZα) καθιστά γρήγορα, εύκολα και φθηνά ανταλλάξιμη την επικράτεια πρόσδεσης του μεταβολίτη. Η απόδειξη επί της αρχής θα γίνει με την εισαγωγή γνωστής επικράτειας πρόσδεσης γλυκόζης. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν *in silico* και κατασκευάστηκαν δύο νέοι αισθητήρες, για την πειραματική ανίχνευση τριτερπενίων και πιο συγκεκριμένα της λουπεόλης. Οι αισθητήρες αυτοί δοκιμάστηκαν τόσο σε συνθήκες *in vitro*, όσο και *in vivo* (σε βακτήρια και φυτά καπνού *Nicotiana benthamiana*) για να ελεγχθεί η λειτουργία τους, τόσο σε πιάτα μικροτιτλοδότησης όσο και με συνεστιακή μικροσκοπία.

Προσδοκούμε πως τα πειραματικά αποτελέσματα του αισθητήρα γλυκόζης θα είναι συγκρίσιμα με αυτά της βιβλιογραφίας [74] ως απόδειξη της αρχής, ενώ παράλληλα τα αποτελέσματα του αισθητήρα λουπεόλης, τόσο μετά από εξωγενή προσθήκη λουπεόλης σε φύλλα καπνού, όσο και φυσιολογικά σε ρίζες του φυτού *Lotus japonicus*, θ' αποτελέσουν την πρώτη πειραματική δοκιμή του συστήματος μας για την ταχεία κατασκευή μοριακών αισθητήρων για νέους μεταβολίτες.

## Υλικά & Μέθοδοι

### Σχεδιασμός τμημάτων DNA προς σύνθεση

Ο FRET Acceptor κατασκευάστηκε σε δύο τμήματα (Synthesized Part 1, 2) μετά από χημική σύνθεση (Integrated DNA Technologies (IDT), USA). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 7, η κατασκευή σχεδιάστηκε με άκρα Golden Gate για τη θέση CDS1 (AATG\_GCTT) και είναι ως εξής (από 5' προς 3'): Κωδική αλληλουχία Cerulean (CFP), ευέλικτος σύνδεσμος 5 αμινοξέων,

λειτουργική μονάδα LacZα, ευέλικτος σύνδεσμος 5 αμινοξέων, κωδική αλληλουχία Venus (YFP).



**Διάγραμμα 7.** Σχηματική αναπαράσταση του FRET Acceptor L0 biopart. Η οπτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα SnapGene. Φαίνονται οι αλληλουχίες δότη (κυανό), δέκτη (κίτρινο), καθώς και η κασέτα LacZα ενδιάμεσα.

Η κατασκευή χωρίστηκε σε δύο τμήματα, διότι η πολυπλοκότητα των αλληλουχιών (κυρίως η επαναληψιμότητα τμημάτων μεταξύ των δύο φθορίζουσών πρωτεϊνών) ήταν μη επιτρεπτή για σωστή σύνθεση. Το αρχικό πλάνο περιλάμβανε την ένωση των τμημάτων χρησιμοποιώντας scarless cloning (Gibson Assembly), γι' αυτό υπήρχε ήδη μία αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή (overlapping region στην εικόνα) 30 νουκλεοτιδίων, η οποία θα επέτρεπε μία τέτοια ένωση. Η προσπάθεια αυτή απέτυχε, και τελικά τα τμήματα DNA ενώθηκαν με one-pot dig-lig αντίδραση (χρήση BbsI).

## Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων υψηλής απόδοσης

Η πλειονότητα των δεκτικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, είχαν δημιουργηθεί μετά από χημική επεξεργασία με χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2$ ). Για να προετοιμάσουμε δεκτικά κύτταρα υψηλής απόδοσης ( $10^8$ - $10^9$  CFU), ακολουθήσαμε τη μέθοδο Inoue [75]. Συνοπτικά, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί επιπρόσθετα αντιδραστήρια, πέραν του  $\text{CaCl}_2$  για τη διάτρηση της μεμβράνης. Παρ' όλα αυτά, το «μυστικό» για την επίτευξη υψηλής απόδοσης κρύβεται στην επώαση των κυττάρων σε χαμηλή θερμοκρασία. Αντί των  $37^\circ\text{C}$ , τα κύτταρα επώάζονται στους  $18^\circ\text{C}$ . Αυτό πιθανολογείται πως έγκειται στα φυσικά χαρακτηριστικά των μεμβρανών που συντίθενται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, αν και δεν έχει αποδειχτεί κάτι τέτοιο.

## Κλωνοποίηση κατασκευών με ένζυμα περιορισμού TypeII

Οι περισσότερες κατασκευές σε αυτή την εργασία, κλωνοποιήθηκαν με χρήση τόσο του Golden Gate, όσο και του GoldenBraid. Πέρα από τους φορείς, οι οποίοι όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή διαφέρουν, το βασικό διακριτικό χαρακτηριστικό των δύο προσεγγίσεων είναι τα ένζυμα περιορισμού. Το Golden Gate χρησιμοποιεί BbsI και BsaI για τις L0 και L1 κατασκευές, ενώ αντίστοιχα το GoldenBraid BsmBI και BsaI. Τα βήματα που ακολουθούνται, είναι παρόμοια και τα εξής:

## Domestication PCR των γενετικών τμημάτων

Έγινε ενίσχυση των τμημάτων με Q5 (New England Biolabs, USA) overhang PCR, σε αντιδράσεις 50  $\mu\text{L}$ . Οι εκκινητές περιέχουν (5' προς 3'): 6 νουκλεοτίδια για τη σωστή πρόσδεση του ενζύμου, αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου, επιθυμητή αλληλουχία κοπής, αλληλουχία συμπληρωματική στο βιομέρος.

Σε περίπτωση που οι επιθυμητές αλληλουχίες περιέχουν αλληλουχίες αναγνώρισης για κάποιο από τα ένζυμα των συστημάτων, προχωρούμε στη διαδικασία «ένταξης»



(domestication). Ουσιαστικά, με χρήση overhang PCR και κατάλληλων εκκινητών, προκαλούμε σιωπηλές μεταλλάξεις στα επιθυμητά σημεία. Τα κομμάτια που δημιουργούνται στη συνέχεια ενώνονται με χρήση TyeIIIS ενζύμων. Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την αυτοματοποιημένη εξημέρωση βιομερών και την αποφυγή λαθών, είναι το [Domesticator Tool](#) (για GB), μία διαδικτυακή εφαρμογή που σχεδιάζει αυτόματα εκκινητές για την ένταξη ενός βιομερούς στο σύστημα GB.

### One-pot dig-lig

Εκτελέστηκαν αντιδράσεις dig-lig σε όγκο 10  $\mu$ L, χρησιμοποιώντας τους εξής κανόνες: ~50ng από κάθε κομμάτι (πχ φορέας-δέκτης, υποκινητής, κωδική αλληλουχία, τερματιστής), 1  $\mu$ L 10X T4 DNA ligase buffer (New England Biolabs, USA), 1  $\mu$ L T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA), 0.5  $\mu$ L TyeIIIS ένζυμο, ddH<sub>2</sub>O μέχρι ο όγκος της αντίδρασης να φτάσει 10  $\mu$ L. Το πρωτόκολλο για την πέψη/ένωση των τμημάτων, είναι το εξής: 50 κύκλοι  $\rightarrow$  37°C για 2 min, 16°C για 5 min, Απενεργοποίηση των ενζύμων στους 80°C για 5 λεπτά.

### Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5 $\alpha$

Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων έγινε ως εξής: τήξη δεκτικών κυττάρων σε πάγο, προσθήκη 5  $\mu$ L αντίδρασης dig-lig και ελαφριά ανάδευση, επώαση στον πάγο για 20-30 λεπτά, θερμικό σοκ στους 42°C για 1 min, επώαση στον πάγο για 2-5 min, προσθήκη 900  $\mu$ L LB (10 g/L peptone, 10 g/L NaCl, 5 g/L Yeast Extract) υπό φλόγα, επώαση για 1 ώρα στους 37°C με ανάδευση 210rpm, επίστρωση σε τρυβλία LB Agar με κατάλληλο αντιβιοτικό (προσθήκη 50  $\mu$ L 20% x-Gal, 10  $\mu$ L 0.1M IPTG για blue-white screening), επώαση 16 ωρών στους 37°C.

### Απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα *E. coli* DH5 $\alpha$

Απομόνωση πλασμιδίου έγινε ύστερα από επώαση 5 mL LB καλλιέργειας με την κατάλληλη αποικία και αντίστοιχο αντιβιοτικό, στους 37°C/210rpm για 16 ώρες. Έγινε χρήση εμπορικού σκευάσματος της Macherey-Nagel (MN Nucleobond Plasmid) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### Επαλήθευση κατασκευής

Η επαλήθευση της κατασκευής έγινε με τα εξής βήματα: 1. Colony PCR, όπου διαλέγονται αποικίες από τα τριβλία, και με κατάλληλους εκκινητές το εισαγόμενο βιομέρος οπτικοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση. Οι αντιδράσεις είναι 20  $\mu$ L. 2. Πέψη με ένζυμα περιορισμού, όπου επιλέγονται ένζυμα που δίνουν ξεχωριστές ζώνες ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. 3. Αλληλούχηση Sanger, όπου η κατασκευή επαληθεύεται τελικά αν έχει προηγηθεί 1. ή/και 2. και τα αποτελέσματα είναι θετικά. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Snapgene, ενώ η ευθυγράμμιση έγινε με το πρόγραμμα [Clustal Omega](#).

### Κλωνοποίηση κατασκευών στον pGEX-6P1

Ο φορέας pGEX-6P1 είναι ένα πλασμίδιο έκφρασης και απομόνωσης πρωτεϊνών. Η επιθυμητή κωδική αλληλουχία εισάγεται μετά από μία ετικέτα GST, η οποία χρησιμοποιείται καθοδικά για την απομόνωση της πρωτεΐνης.





μεταφέρθηκαν πίσω στο σωληνάριο. Έπειτα, έγινε επώαση των κυττάρων στους 28°C/160rpm για 2-3h και επίστρωση σε τριβλία LB Agar με κατάλληλο αντιβιοτικό (Γκενταμικίνη 10 µg/mL για το πλασμίδιο Ti και κατάλληλο αντιβιοτικό για τον παροδικό φορέα). Ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους 28°C για 48 h.

### Παροδική έκφραση σε φύλλα *Nicotiana benthamiana*

Σπόροι φυτών *N. benthamiana* WT αποστειρώθηκαν με πλύσεις 10% χλωρίνης και έπειτα ddH<sub>2</sub>O. Οι σπόροι μοιράστηκαν σε τριβλίο 0,8% water agar (απόσταση 1,5 – 2 εκ. μεταξύ των σπόρων). Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι, θερμοκρασία 21-23°C, υγρασία 65-70% για 48h και έπειτα επώαση σε φως, με φωτοπερίοδο 16h ημέρα, 8h νύχτα. Μετά από δύο εβδομάδες, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε γλάστρες με υπόστρωμα φυτοχώματος:βερμικουλίτη, αναλογίας 3:1. Τα φυτά είναι έτοιμα για infiltration σε ηλικία περίπου 4 εβδομάδων.

Κλώνοι *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 με τις επιθυμητές κατασκευές εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB όγκου 5 mL για 1 με 2 ημέρες με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, στους 28°C/160rpm. Την ημέρα του πειράματος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (5.000 x g για 15 min) και επαναδιαλύθηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES-K (pH 5,6), 100 µM ακετοσυριγκόνη (προστίθεται μετά την αποστείρωση). Τα κύτταρα έμειναν στον πάγκο για 2-3 h (για να ενεργοποιηθεί η μολυσματικότητά τους από την ακετοσυριγκόνη) και στη συνέχεια το η πυκνότητα διαμορφώθηκε στο OD<sub>600</sub> = 0.4. Ο εμβολιασμός των φύλλων έγινε με αποστειρωμένες σύριγγες 2 mL, από τις οποίες είχαν αφαιρεθεί οι βελόνες. Για να περάσει το διάλυμα στο φύλλο, αρκεί να πιέσουμε ελαφρά τη σύριγγα στην κάτω (abaxial) πλευρά του φύλλου, χωρίς να στοχεύουμε αγγεία. Μετά από σήμανση των περιοχών στα φύλλα, έγινε έκφραση των κατασκευών για 48-72 h.

### Συνεστιακή μικροσκοπία για οπτικοποίηση FRET

Συνεστιακή μικροσκοπία έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss LSM800 συνδεδεμένο σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss Axiovert (Zeiss, Jenna, Germany). Με αντικειμενικό φακό 20x/0.87NA, χωρίς μέσο εμβάπτισης. Η οπή συνεστιακής δέσμης (pinhole) ρυθμίστηκε στα 100µM για όλες τις γραμμές διέγερσης/ανίχνευσης (~2-2.5 airy units ανάλογα με το μήκος κύματος του διεγείροντος LASER). Διέγερση της mCerulean3 έγινε με LASER διόδου μήκους κύματος 405nm και ανίχνευση σε εύρος μηκών κύματος 480/20nm. Αντίστοιχα, διέγερση της mVenusQ69M έγινε στα 488nm και ανίχνευση σε εύρος μηκών κύματος 535/15. Ανίχνευση του φαινομένου FRET έγινε με διέγερση της mCerulean3 στα 405nm και ανίχνευση φθορισμού της mVenusQ69M σε εύρος μηκών κύματος 535/15. Κατασκευές-μάρτυρες mCerulean3 και mVenusQ69M χρησιμοποιήθηκαν για υπολογισμό μη-ειδικού φθορισμού (bleedthrough) στη γραμμή ανίχνευσης FRET, ενώ αρνητικός μάρτυρας με άδειο φορέα χρησιμοποιήθηκε για υπολογισμό του φθορισμού υποβάθρου στις πειραματικές ρυθμίσεις λήψης. Λήψη εικόνων έγινε σε 8-bit, 512x512 pixels, ως μέσος όρος 2 λήψεων ανά pixel. Υπολογισμός του λόγου FRET έγινε κατά Fehr et al. 2003 [74] και ο υπολογισμός του δείκτη FRET έγινε κατά Hachet-Haas et al. 2006 [81]. Ποσοτικοποίηση της μέσης έντασης φθορισμού και του δείκτη FRET έγινε με το πρόγραμμα FIJI/Image J. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε ο μέσος όρος 3-6 εικόνων από ανεξάρτητες περιοχές/φύλλα.

## Μέτρηση φθορισμού σε plate-reader

Οι μετρήσεις φθορισμού για το *in vitro* τμήμα της εργασίας έγιναν σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold (Stratagene) με τη χρήση plate-reader. Συνοπτικά, τα μετασηματισμένα με τις κατάλληλες κατασκευές βακτήρια, εμβολιάστηκαν σε υγρές καλλιέργειες LB όγκου 5 mL με το κατάλληλο αντιβιοτικό (Καρμπενικιλίνη 100 µg/mL) και επωάστηκαν σε συνθήκες 37°C/210rpm για 16 ώρες, ή μέχρι να φτάσουν σε κορεσμό ( $OD_{600} = 2$ ). Ακολούθησε εμβολιασμός νέων καλλιεργείων με ελάχιστο θρεπτικό M9 όγκου 1 mL, οπτικής πυκνότητας  $OD_{600} = 0.1$ , με κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού και 1 µM IPTG, το οποίο επάγει την έκφραση στο φορέα. Κάθε καλλιέργεια με κατάλληλη κατασκευή (FRET, controls κλπ.) είναι και μία βιολογική επανάληψη. Στη συνέχεια από κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 600 µL για την πλήρωση τριών πηγαδιών σε πιάτο 96 πηγαδιών. Τα τρία πηγάδια κάθε καλλιέργειας αποτελούν τις τεχνικές επαναλήψεις του πειράματος. Το θρεπτικό M9 χρησιμοποιήθηκε έναντι του LB, διότι δημιουργεί ελάχιστο θόρυβο όσον αφορά το φθορισμό (δεν περιέχει yeast extract, το οποίο περιέχει αμινοξέα, και ενώσεις τα οποία έχουν αρωματικούς δακτυλίους).

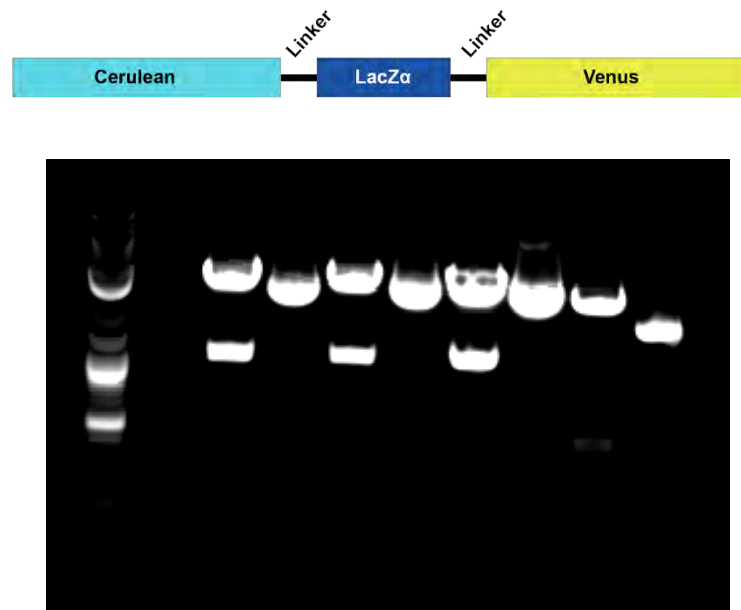
Για τη διεξαγωγή του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε το multimode microplate reader Varioskan™ Lux (Thermo Scientific). Το πρόγραμμα που σχεδιάστηκε είναι το εξής: Μέτρηση κάθε μία ώρα της κυτταρικής πυκνότητας ( $OD_{600}$ ), καθώς και του φθορισμού (διέγερση στα 433 και 515, απορρόφηση εκπομπής στα 475nm και 527nm για Cerulean και Venus αντίστοιχα), για 24 ώρες. Στα πειράματα FRET, έγινε διέγερση μόνο στα 475nm (Cerulean), ενώ μετρήθηκε η εκπομπή στα φάσματα και των δύο FPs. Το plate reader διατήρησε καθ' όλη τη διάρκεια θερμοκρασία 37°C ενώ υπήρχαν φάσεις ανακίνησης και μη, με συχνότητα 5sec:15sec αντίστοιχα, ώστε τα κύτταρα να μην κατακρημνιστούν στον πάτο των πηγαδιών.

Για την ανάλυση των δεδομένων, έγινε χρήση του Microsoft Excel. Οι μετρήσεις υπόβαθρου (θόρυβος) αφαιρέθηκαν μέσω κανονικοποίησης από πηγάδια που περιείχαν μόνο θρεπτικό M9. Ο φθορισμός από κάθε τιμή κανονικοποιήθηκε με βάση την οπτική πυκνότητα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές επαναλήψεις κάθε καλλιέργειας.

## Αποτελέσματα

### Κατασκευή του bio-part δέκτη FRET (FRET Acceptor)

Η επιτυχία του συστήματος που προτείνουμε έγκειται στην ικανότητα κατασκευής εξατομικευμένων αλλά τυποποιημένων αισθητήρων, διατηρώντας χαμηλό κόστος, μικρή ανάγκη για πειραματικές τροποποιήσεις και γρήγορη κατασκευή. Για να επιτευχθεί αυτό, κατασκευάσαμε ένα δέκτη FRET (FRET Acceptor), ο οποίος αποτελείται από τις φθορίζουσες πρωτεΐνες ενός αισθητήρα FRET (mCerulean3 και mVenusQ69M), μία κασέτα έκφρασης LacZa και συνδετικές αλληλουχίες (linkers) (Διάγραμμα 9).



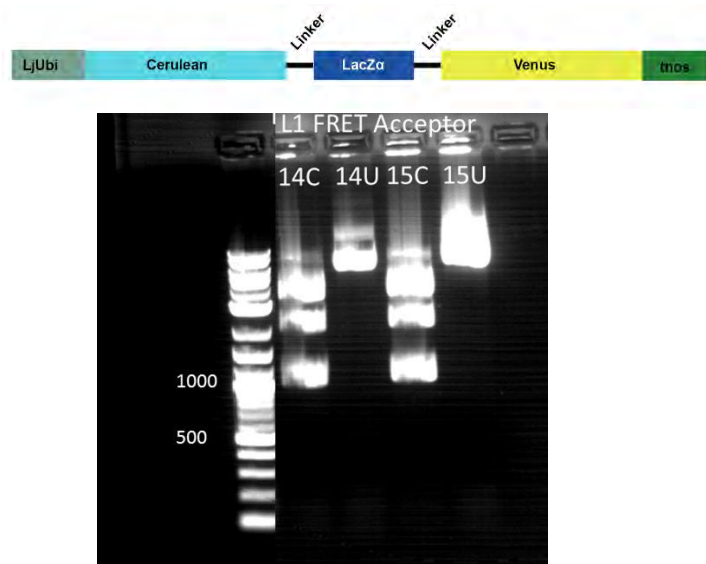
**Διάγραμμα 9.** Σχηματική αναπαράσταση του FRET Acceptor bio-part (άνω) και επαλήθευση με διαγνωστικές πέψεις μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (κάτω). Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

Ακολουθώντας το πρότυπο PhytoBricks, δημιουργήσαμε έναν Level 0 (L0) FRET Acceptor (pICH41308-FA), ο οποίος προορίζεται για τη θέση CDS1 (AATG\_GCTT άκρα). Οι συνδετικές αλληλουχίες είναι σχεδιασμένες έτσι, ώστε να κωδικοποιούν για αμινοξέα με μικρή πλευρική αλυσίδα, το οποίο καθιστά την αμινοξική αλληλουχία εύκαμπτη. Ακόμη, οι συνδετικές αλληλουχίες φιλοξενούν δύο θέσεις περιορισμού (μία ανά αλληλουχία) για το *TyrellS* ένζυμο *BsmBI*, με το οποίο γίνεται η ένθεση της επικράτειας πρόσδεσης μεταβολίτη. Οι θέσεις *BsmBI* είναι τοποθετημένες έτσι, ώστε μετά την ένθεση της επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, επιτρέπεται συνεχής έκφραση όλου του τμήματος χωρίς δημιουργία κωδικονίου λήξης ή frame-shifting.

Μετά την κατασκευή του L0 τμήματος, προχωρήσαμε στη συναρμολόγηση μεταγραφικών μονάδων (TUs) Level 1 (L1) για τον FRET Acceptor. Σκοπός είναι η ένθεση της επικράτειας πρόσδεσης να γίνεται στο επίπεδο L1 του FRET Acceptor, ώστε να αποφεύγεται ένα επιπλέον βήμα κλωνοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, αν η ένθεση της επιθυμητής επικράτειας γινόταν στο L0 FA (κάτι το οποίο είναι εφικτό), για κάθε ξεχωριστή επικράτεια θα έπρεπε να ακολουθήσει συναρμολόγηση ξεχωριστής L1 μεταγραφικής μονάδας, η οποία ως επί τω πλείστων αποτελείται από ίδια κομμάτια εκτός της επικράτειας που ενθέτουμε.

Για τη συγκεκριμένη εργασία, συναρμολογήσαμε δύο μεταγραφικές μονάδες: 1) μία μεταγραφική μονάδα για έκφραση σε φυτά και 2) μία μεταγραφική μονάδα για υπερέκφραση σε βακτήρια και απομόνωση της πρωτεΐνης.

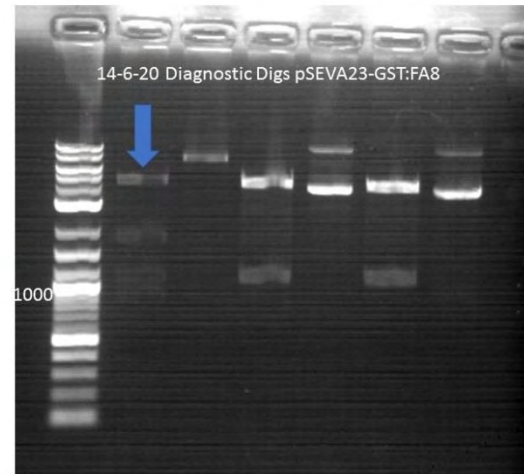
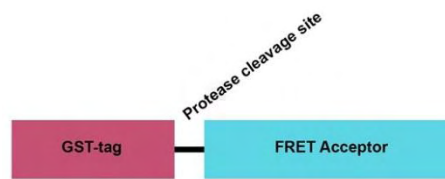
Για τη φυτική κατασκευή, επιλέξαμε η έκφραση της κατασκευής να γίνεται από τον υποκινητή της ουβικουιτίνης του *Lotus japonicus* LjUbi500i, ο οποίος έχει δειχθεί πως λειτουργεί τόσο στο *L. Japonicus* [82], όσο και στη *Nicotiana benthamiana* (Garagounis C. unpublished data), ένα φυτό μοντέλο το οποίο επιτρέπει γρήγορη και εύκολη παροδική έκφραση της κατασκευής στα φύλλα του. Για τον τερματισμό της μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ο τερματιστής του γονιδίου της συνθάσης της νοπαλίνης του *Agrobacterium tumefaciens* tNOS. Η μεταγραφική μονάδα κατασκευάστηκε και επιβεβαιώθηκε με διαγνωστικές PCR, πέψεις με ένζυμα περιορισμού και αλληλούχηση Sanger (Διάγραμμα 10).



**Διάγραμμα 10.** Σχηματική αναπαράσταση του L1 FRET Acceptor (άνω) και επιβεβαίωση της συναρμολόγησης ύστερα από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και XmnI και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%. Το αναμενόμενο προφίλ ζωνών στους θετικούς κλώνους είναι 3638 bp, 2189 bp, 1110 bp και 1091 bp. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

Για τη βακτηριακή κατασκευή υπερέκφρασης, εκμεταλλευτήκαμε τα πλασμίδια της βιβλιοθήκης SEVA και επιμέρους κομμάτια από το φορέα υπερέκφρασης pGEX6P-1. Πιο συγκεκριμένα, ο φορέας pSEVA23 (Kan<sup>R</sup>, pBBR1 medium-cory ori) τροποποιήθηκε με κατάλληλα άκρα, ώστε να υποδεχτεί τον υποκινητή *trc-lacO*, ένα GST-tag που επιτρέπει χρωματογραφία συγγένειας, μια θέση πέψης από πρωτεάση για την καθοδική αφαίρεση του GST-tag (που μπορεί να επηρεάσει μετρήσεις στην αλλαγή FRET), καθώς και το LO FRET Acceptor part. Ο φορέας φέρει τερματιστή της μετάφρασης, επομένως δεν χρειάστηκε η επιπλέον προσθήκη του στην κατασκευή. Η επιτυχής συναρμολόγηση της κατασκευής (Διάγραμμα 11) επιβεβαιώθηκε με τις διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για το φυτικό TU.





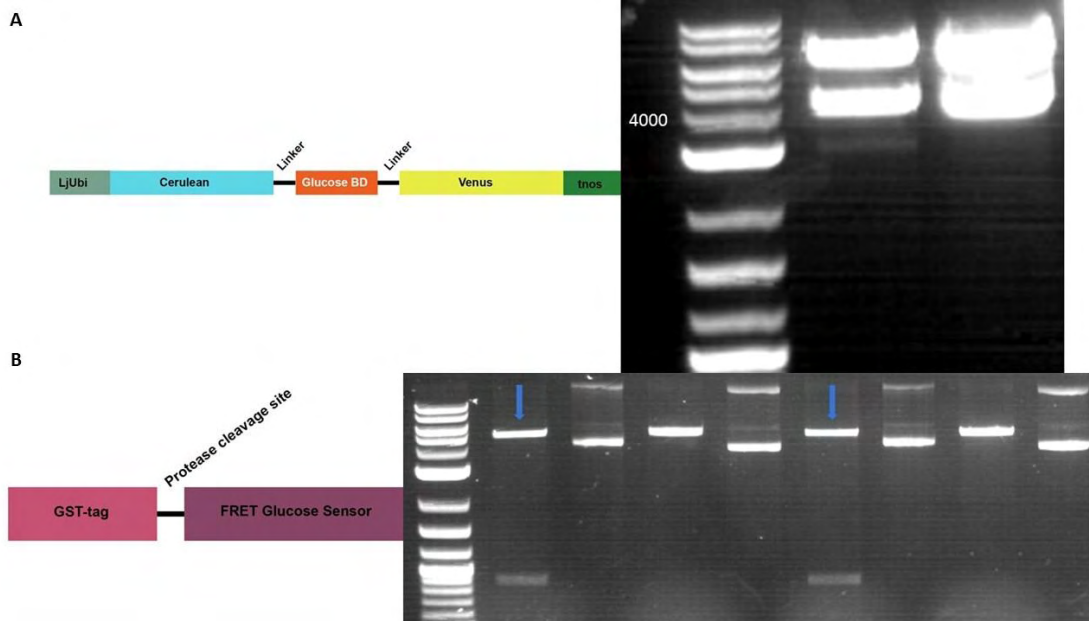
**Διάγραμμα 11.** Σχηματική αναπαράσταση της βακτηριακής μεταγραφικής μονάδας υπερέκφρασης (ο υποκινητής *trc-lacO* περιλαμβάνεται στο GST-tag) (δεξιά), καθώς και επιβεβαίωση με διαγνωστικές πέψεις (αριστερά). Ο θετικός κλώνος (όπως φάνηκε και από αλληλούχηση Sanger), είναι αυτός που υποδεικνύεται με το μπλε βέλος, έχοντας και το σωστό προφίλ ζωνών DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

## Κατασκευή πρότυπων βιοαισθητήρων FRET με τη χρήση του FRET Acceptor

Με σκοπό την επιβεβαίωση της λειτουργίας του FRET Acceptor ως ένα τμήμα υποδοχής επικρατειών πρόσδεσης και λειτουργικής έκφρασης βιοαισθητήρων, προχωρήσαμε στην κατασκευή βιοαισθητήρων για δύο μεταβολίτες, τη γλυκόζη και τη λουπεόλη.

### Γλυκόζη

Η επικράτεια και ο σχεδιασμός του αισθητήρα γλυκόζης προέρχεται από τη βιβλιογραφία [74], επομένως η επαναληψιμότητα των δεδομένων στην αλλαγή FRET και τις αναλογίες φθορισμού μεταξύ δότη και δέκτη είναι δυνατόν να επιβεβαιώσουν τον πειραματικό σχεδιασμό του FRET Acceptor. Έτσι, προχωρήσαμε στην ανακατασκευή του αισθητήρα, τόσο για φυτική (Διάγραμμα 12A) όσο και βακτηριακή (Διάγραμμα 12B) έκφραση.

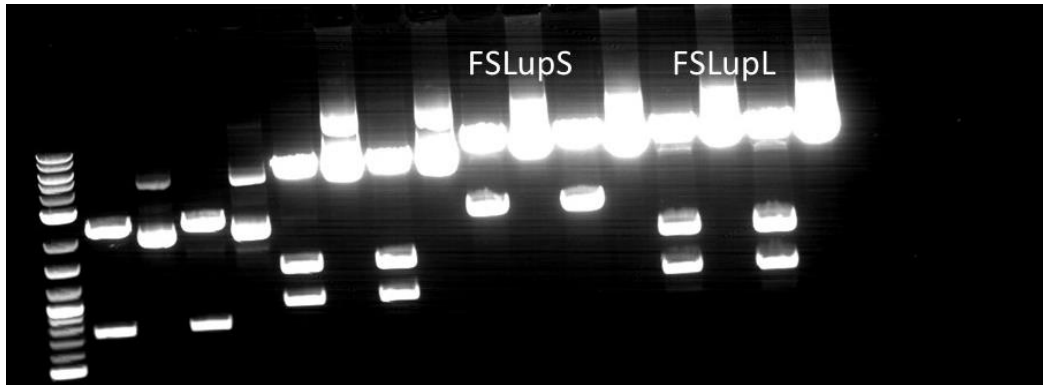


**Διάγραμμα 12.** Α) Σχηματική αναπαράσταση (αριστερά) και επιβεβαίωση με διαγνωστικές πέψεις (δεξιά) της φυτικής μεταγραφικής μονάδας του βιοαισθητήρα FRET για ανίχνευση γλυκόζης. Το προφίλ ζωνών των θετικών κλώνων είναι 6100 bp, 4100 bp. Β) Σχηματική αναπαράσταση (αριστερά) και επιβεβαίωση με διαγνωστικές πέψεις με KpnI (δεξιά) της βακτηριακής μεταγραφικής μονάδας. Το προφίλ ζωνών των θετικών κλώνων είναι: 5032 bp, 879 bp. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

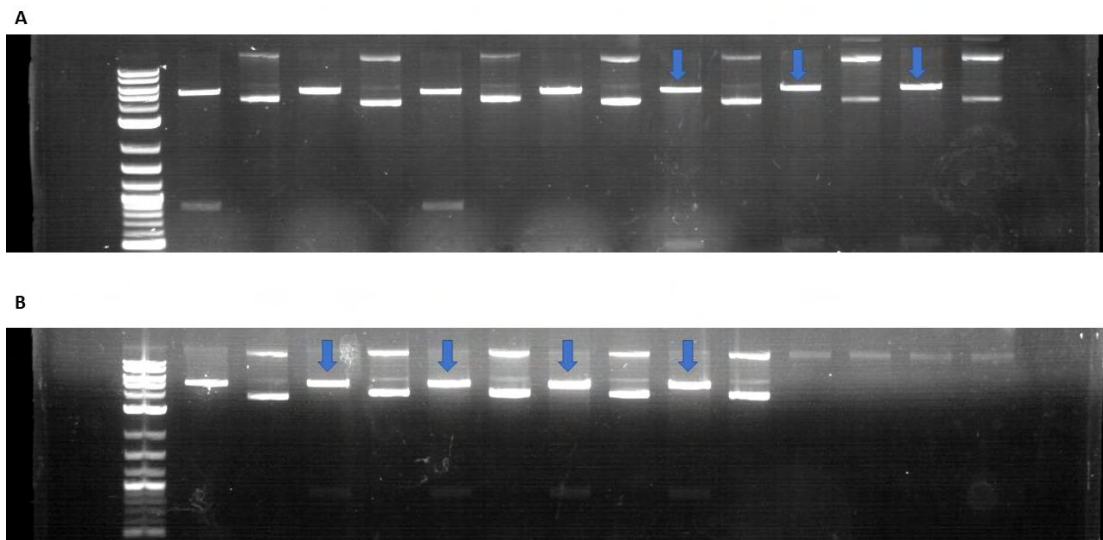
## Λουπεόλη

Με κεντρικό στόχο τη σάρωση νέων επικρατειών πρόσδεσης, με στόχευση κυρίως σε εξειδικευμένους φυτικούς μεταβολίτες, επιλέξαμε το δεύτερο μόριο για την εργασία αυτή να είναι η λουπεόλη. Η λουπεόλη είναι ένα τριτερπένιο, δευτερογενής φυτικός μεταβολίτης που παράγεται από την κυκλοποίηση του σκουαλενίου και φαίνεται να έχει αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [75]. Επιπλέον, προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας χαρακτήρισε μία φυτική κινάση, την LSK1 [76], για την οποία υπάρχει η υπόθεση πως η λουπεόλη προσδένεται αλλοστερικά. Για την κατασκευή του βιοαισθητήρα λουπεόλης, χρησιμοποιήσαμε δύο τμήματα της LSK1: την επικράτεια πρόσδεσης του ATP (όπου πιστεύεται πως προσδένεται και η λουπεόλη), καθώς και την επικράτεια με λειτουργία κινάσης (όπου περιλαμβάνεται και η επικράτεια πρόσδεσης του ATP). Χάριν ευκολίας, απλοποιήσαμε τις ονομασίες σε LupShort (LupS) για το ATP BD και LupLong (LupL) για το Kinase BD. Η κατασκευή των φυτικών μεταγραφικών μονάδων των βιοαισθητήρων λουπεόλης φαίνεται στο Διάγραμμα 13, ενώ η κατασκευή των βακτηριακή μεταγραφικών μονάδων φαίνεται στο Διάγραμμα 14.





**Εικόνα 13.** Διαγνωστικές πέψεις που επιβεβαιώνουν τις φυτικές μεταγραφικές μονάδες των βιοισθητήρων λουπεόλης. Το αναμενόμενο προφίλ ζωνών για τους θετικούς κλώνους είναι: FSLupShort, HindIII, 5827 bp, 2077 bp FSLupLong, HindIII, SacI-HF, 5827 bp, 1486 bp, 980 bp. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).



**Διάγραμμα 14.** Α) Επιβεβαίωση με διαγνωστικές πέψεις των βακτηριακών κατασκευών LupS και Β) Επιβεβαίωση με διαγνωστικές πέψεις των βακτηριακών κατασκευών LupL. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τους θετικούς κλώνους, όπου το προφίλ ζωνών DNA είναι το επιθυμητό (5032 bp, 486 bp για το LupS, 5032, 875 bp για το LupL) μετά από πέψη με KpnI. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA).

Χρησιμοποιώντας τη δύναμη της τυποποίησης και χιζοντας πάνω σε προηγούμενα DNA Assembly Standards, όπως τα PhytoBricks, καταφέραμε να κατασκευάσουμε τους βιοισθητήρες γλυκόζης και λουπεόλης με τη χρήση του FRET Acceptor σε ένα ελάχιστο χρόνο τριών ημερών ανά κατασκευή.

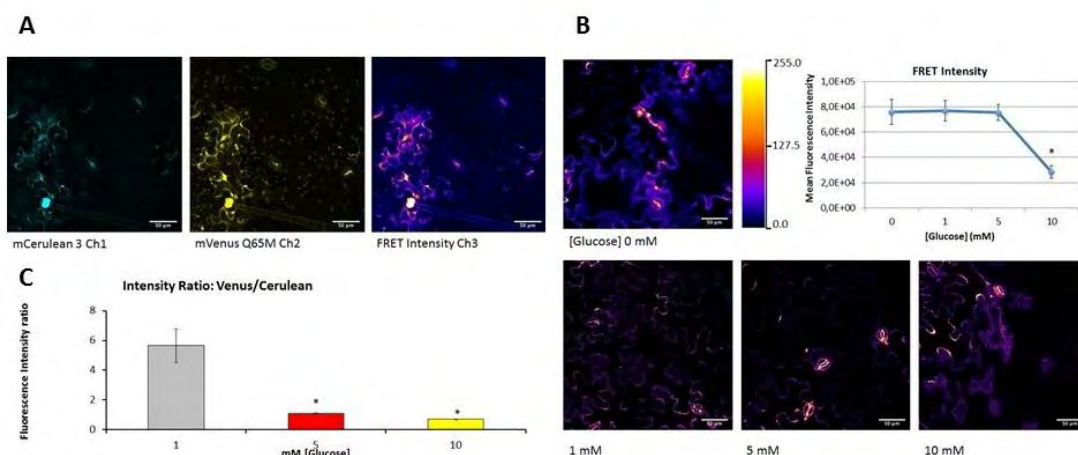
## Επιβεβαίωση έκφρασης των βιοαισθητήρων FRET σε φυτά

Το πρώτο βήμα για την μελέτη της λειτουργικότητας των βιοαισθητήρων που κατασκευάσαμε, ήταν η έκφραση τους στα φυτά. Για την έκφραση, χρησιμοποιήσαμε το φυτό μοντέλο *Nicotiana benthamiana* (*Nt*), το οποίο επιτρέπει στην εύκολη και γρήγορη παροδική έκφραση φυτικών μεταγραφικών μονάδων και την άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Στα πειράματά μας, έγινε συν-μετασηματισμός των φύλλων *Nt* με δύο φορείς έκφρασης: 1) το φορέα που περιείχε τη μεταγραφική μονάδα του βιοαισθητήρα υπό μελέτη, και 2) έναν φορέα έκφρασης του p19 suppressor of silencing γονιδίου. Το γονίδιο αυτό προέρχεται από την ιική οικογένεια των *Tombusviridae* και αναστέλλει τη σίγηση γονιδίων μέσω RNAi. Λόγω της μεγάλης ομοιότητας των αλληλουχιών των γονιδίων δότη και δέκτη, οι φυτικοί μηχανισμοί πιθανώς δημιουργούν siRNAs, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση. Η καταστολή αυτή αναστέλλεται με την έκφραση του p19.

### Γλυκόζη

Ο στόχος των φαινοτυπικών πειραμάτων με τον βιοαισθητήρα της γλυκόζης (FSGlu), ήταν η παραγωγή συγκρίσιμων με τη βιβλιογραφία αποτελεσμάτων. Ο αισθητήρας αυτός έχει δείχθει πως παρουσιάζει μείωση στην αναλογία FRET (FRET ratio) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης [74]. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 15, έγινε επιτυχής έκφραση του βιοαισθητήρα σε φύλλα *Nt*. Στο Διάγραμμα 15A φαίνονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας. Τα τρία κανάλια που φαίνονται είναι: Cerulean (donor) με κυανό, Venus (acceptor) με κίτρινο χρώμα, καθώς και η ένταση FRET, της οποίας το χρώμα είναι βαθμονομημένο ανάλογα την ένταση (color graded format). Το διάγραμμα 15B απεικονίζεται η ένταση του καναλιού FRET, με επιλεγμένα σημεία από  $n = 18$  data points. Για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης, τουλάχιστον έξι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση. Μείωση στην ένταση FRET παρατηρείται μόνο σε συγκέντρωση εκτοπικής γλυκόζης 10 mM. Ο λόγος του FRET Intensity σκιαγραφείται στο Διάγραμμα 15C. Εκεί φαίνεται πως 5 mM εκτοπικής γλυκόζης είναι αρκετά ώστε να μειωθεί η τιμή με στατιστικά σημαντική διαφορά.

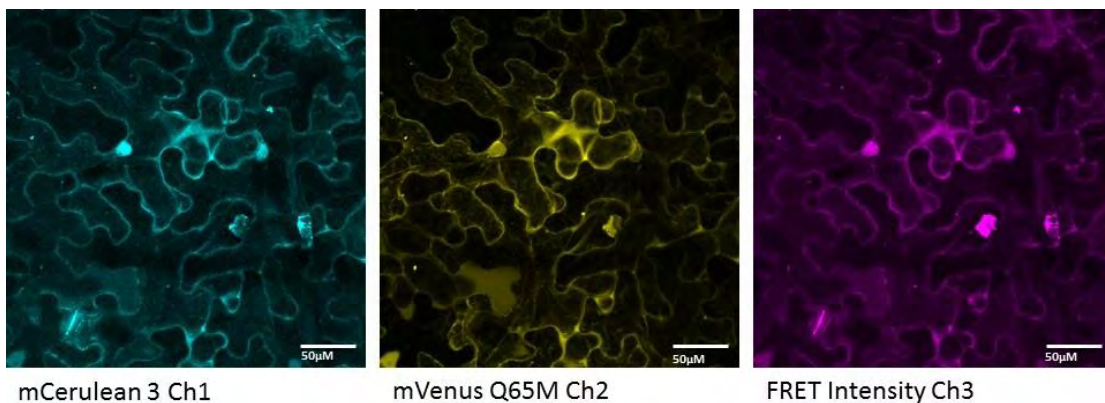


**Διάγραμμα 15.** Συνεστιακή μικροσκοπία για τον FSGlu, σε μετασηματισμένα φύλλα *N. benthamiana*. Οι τιμές που φαίνονται στα διαγράμματα είναι Average  $\pm$  SEM (Standard Error Mean)

από  $n = 18$  data points, τα οποία προήλθαν από έξι ανεξάρτητες φωτογραφίες ανά συγκέντρωση γλυκόζης. Η επιλογή των data points στις εικόνες ήταν τέτοια, ώστε να αποκλείονται περιοχές θετικού σφάλματος, όπως στοματικά κύτταρα, κύτταρα από τα τριχοειδή κλπ., που παράγουν αυτοφθορισμό. Οι αστερίσκοι στα διαγράμματα απεικονίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ) από τη συγκέντρωση γλυκόζης 1 mM. Η στατιστική ανάλυση έγινε με Turkey's HSD post hoc test, έπειτα από one-way ANOVA.

### Λουπεόλη

Εφόσον φάνηκε πως ο βιοαισθητήρας γλυκόζης είναι λειτουργικός, προχωρήσαμε στην έκφραση των βιοαισθητήρων της λουπεόλης σε φύλλα *N. benthamiana*, όπως προηγουμένως. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 16, η έκφραση του FSLupS ήταν επιτυχής, αφού παρατηρείται φθορισμός και από τις δύο φθορίζουσες πρωτεΐνες του βιοαισθητήρα.



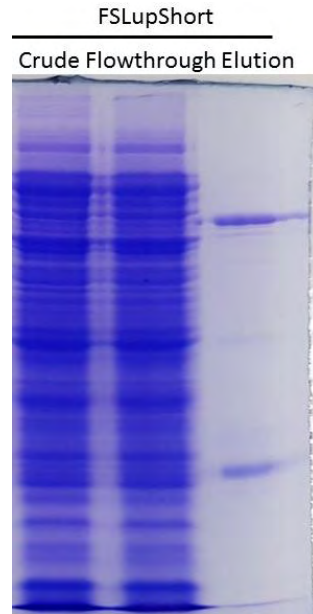
**Διάγραμμα 16.** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας σε μετασηματισμένα φύλλα καπνού. Τα φύλλα συν-μετασηματίστηκαν με τη φυτική μεταγραφική μονάδα FSLupS και το φορέα έκφρασης p19 suppressor of silencing. Από αριστερά προς δεξιά, οι εικόνες δείχνουν : Φθορισμός του Cerulean (cyan color), Venus (yellow color) και ένταση FRET (magenta color).

Είναι φανερό πως υπάρχει ικανοποιητική έκφραση του βιοαισθητήρα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, ενώ δεν υπάρχει συσσώρευση πχ. στο ενδοπλασματικό δίκτυο, κάτι που είναι θετικό.

### Βακτηριακή έκφραση, απομόνωση και μελέτη των βιοαισθητήρων

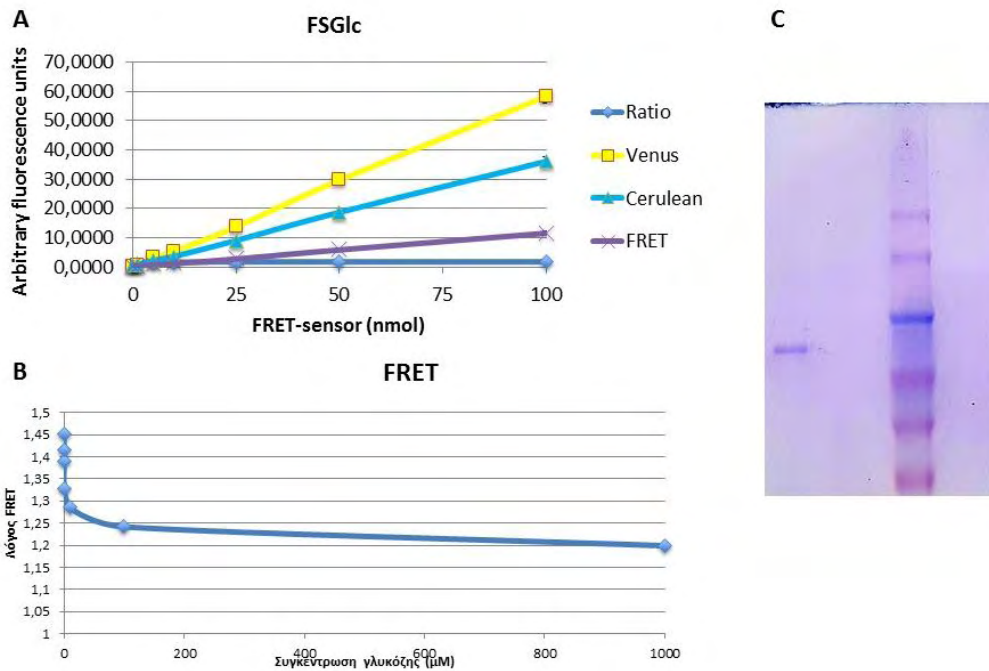
Το επόμενο βήμα στην επικαιροποίηση του σχεδιασμού, ήταν η έκφραση των βακτηριακών μεταγραφικών μονάδων και έπειτα η απομόνωση τους και η μελέτη τους σε καθαρή μορφή με γνωστές συγκεντρώσεις μεταβολιτών. Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε έκφραση των βακτηριακών κατασκευών στο στέλεχος έκφρασης *E. coli* BL21 (DE3) Gold.

Μετά από απομόνωση των FSGlu (Διάγραμμα 18C) και FSLupS (Διάγραμμα 17), έγινε μελέτη τους με γνωστές συγκεντρώσεις του κάθε μεταβολίτη.



**Διάγραμμα 17.** Οπτικοποίηση πρωτεϊνών με τη χρωστική Coomassie blue, έπειτα από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15%.

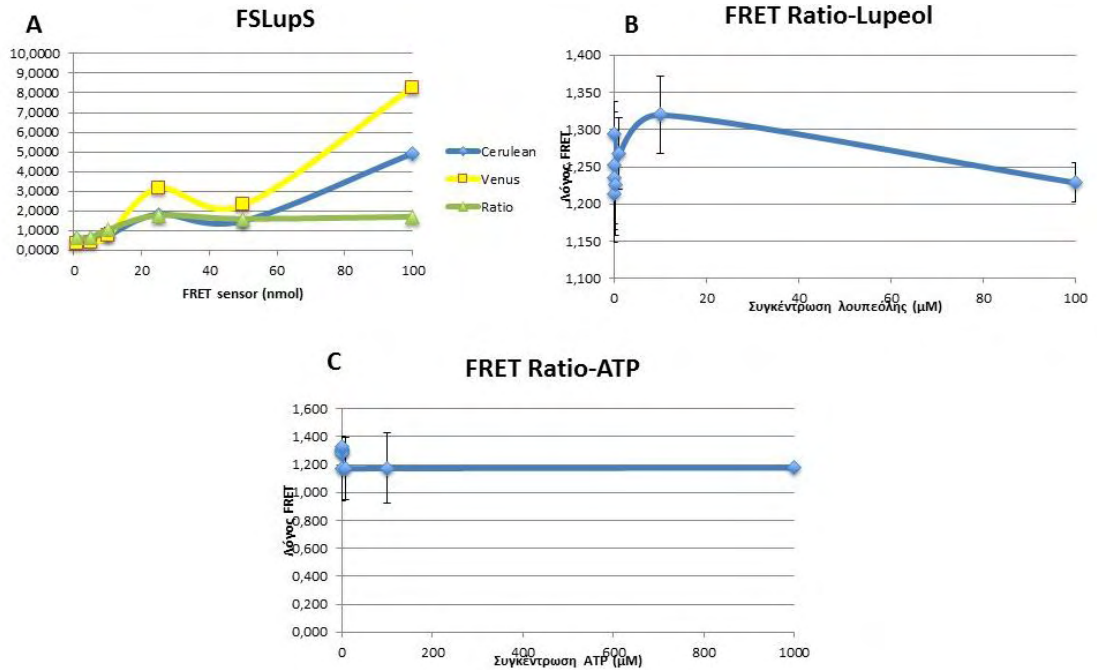
Στο Διάγραμμα 18 φαίνονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού του βιοαισθητήρα γλυκόζης. Στο 18A, βλέπουμε τον παραγόμενο φθορισμό του απομονωμένου βιοαισθητήρα γλυκόζης, απουσία γλυκόζης, σε πρωτεϊνική ποσότητα. Με την αύξηση της ποσότητας, ο φθορισμός που παράγει τόσο το Cerulean, όσο και Venus αυξάνεται, ενώ ο λόγος FRET παραμένει σταθερός. Αυτό είναι αναμενόμενο, αφού οι δύο φθορίζουσες υπάρχουν στην ίδια κατασκευή και εκφράζονται μαζί. Επίσης, ο λόγος FRET σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης, έχει καθοδική τάση, συμβαδίζοντας τόσο με τα πειραματικά όσο και με τα βιβλιογραφικά [74] δεδομένα.



**Διάγραμμα 18.** Χαρακτηρισμός του απομονωμένου βιοαισθητήρα γλυκόζης. Α) Παραγόμενος φθορισμός του βιοαισθητήρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ο φθορισμός κάθε φθορίζουσας αυξάνεται μεμονωμένα, όμως λόγος (ratio) παραμένει σταθερός, επειδή τα πρωτεϊνικά μόρια δότη και δέκτη είναι ισόποσα (βρίσκονται στον ίδιο αισθητήρα). Β) Ο λόγος FRET του αισθητήρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Υπάρχει μία καθοδική τάση, όσο οι τιμές πλησιάζουν τα 10 mM. Γ) Πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρώση Coomassie Blue, όπου φαίνεται η απομονωμένη πρωτεΐνη FSGlu.

Για τους βιοαισθητήρες της λουπεόλης, σε αυτή την εργασία εκφράστηκε και χαρακτηρίστηκε ο FSLupS. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 19Α, ο παραγόμενος φθορισμός από τους δότη και δέκτη FPs αυξάνεται με την αύξηση της πρωτεϊνικής ποσότητας, ενώ ο λόγος FRET παραμένει σταθερός. Αυτό υποδεικνύει πως η έκφραση είναι επιτυχής και οι πρωτεΐνες βρίσκονται συνδεδεμένες (fused).





**Διάγραμμα 19.** Χαρακτηρισμός του απομονωμένου βιοαισθητήρα λουπεόλης FSLupS. χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις μεταβολιτών. Α) Παραγόμενος φθορισμός του βιοαισθητήρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ο φθορισμός κάθε φθορίζουσας αυξάνεται μεμονωμένα, όμως λόγος (ratio) παραμένει σταθερός, επειδή τα πρωτεϊνικά μόρια δότη και δέκτη είναι ισόποσα (βρίσκονται στον ίδιο αισθητήρα). Β) Ο λόγος FRET του αισθητήρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις λουπεόλης. Γ) Ο λόγος FRET του αισθητήρα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ATP

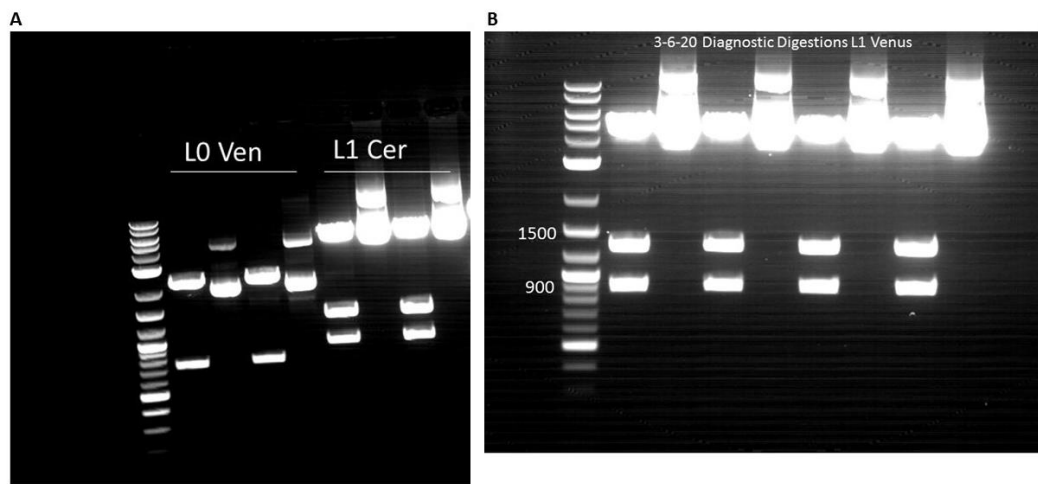
Αυξανόμενες συγκεντρώσεις λουπεόλης δεν επηρέασαν το λόγο FRET του αισθητήρα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 19B. Αυτό υποδεικνύει πως ο βιοαισθητήρας δεν είναι λειτουργικός υπό αυτές τις συνθήκες. Πιθανώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η λουπεόλη είναι υδροφοβικό μόριο, ενώ η πρόσδεσή του στη συγκεκριμένη επικράτεια δεν είναι αποδεδειγμένη. Επειδή το ATP είναι επιβεβαιωμένο αλλοστερικό υπόστρωμα και υδρόφιλο μόριο, έγινε προσθήκη αυτού αντί της λουπεόλης. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 19C, δεν προκλήθηκε αλλαγή μετά από προσθήκη εξωγενούς ATP, κάτι που υποδεικνύει πως ο βιοαισθητήρας δε λειτουργεί ούτε σε αυτές τις συνθήκες, είτε λόγω μη αλλαγής στερεοχημικής διαμόρφωσης, είτε λόγω μη αλλαγής του λόγου FRET.

### Συναρμολόγηση κατασκευών μαρτύρων (controls)

Για τη διεξαγωγή μίας σωστής ανάλυσης, είναι αναγκαίο να λαμβάνεται υπ' όψει το θετικό σφάλμα που προκύπτει από τη μέτρηση. Στη δική μας περίπτωση, το θετικό σφάλμα υπάρχει λόγω της επικάλυψης των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης των δύο φθορίζουσών πρωτεϊνών, του mCerulean3 και του mVenusQ69M. Όταν γίνεται η μέτρηση του FRET, η ενέργεια που προσφέρουμε στο σύστημα είναι σε μήκος κύματος μόνο για το mCerulean3, δηλαδή 405 nm στην περίπτωσή μας. Στη συνέχεια, μετρούμε την απορρόφηση στο φάσμα απορρόφησης του mVenusQ69M και όχι του Cerulean, ώστε να δούμε την ενέργεια που μεταφέρθηκε από το δότη στο δέκτη. Παρ' όλα αυτά, υπάρχει μερική επικάλυψη, ιδίως στα φάσματα εκπομπής των δύο πρωτεϊνών. Έτσι, όταν μετράμε στο

φάσμα απορρόφησης του Venus, αναπόφευκτα έχουμε θετικό σφάλμα από φθορισμό του Cerulean.

Την επίλυση αυτού του προβλήματος έρχονται να δώσουν οι κατασκευές μάρτυρες (bleed-through controls). Αυτές οι κατασκευές έχουν τα ίδια ρυθμιστικά στοιχεία με τις μεταγραφικές μονάδες των βιοαισθητήρων (LjUbi500i και tNOS), ενώ περιέχουν μόνο τη μία εκ των δύο FP's κάθε φορά. Έτσι, δημιουργήσαμε τα L0 bioparts για το Cerulean (Cer) και Venus (Ven), καθώς και τις L1 μεταγραφικές μονάδες τους, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 20 (δε φαίνεται το L0 Cer). Οι κατασκευές αυτές θα βοηθήσουν στη σωστή ανάλυση των δεδομένων.



**Διάγραμμα 20.** Φωτογραφίες πηκτών αгарόζης 1%, όπου φαίνονται οι διαγνωστικές πέψεις των κατασκευών φυτικών μεταγραφικών μονάδων για τους μάρτυρες. Ο μάρτυρας (Ladder) είναι ο 1 kb Plus 100-10.000bp (πρώην Log2) (New England Biolabs, Cambridge, USA). Τα προφίλ ζωνών που φαίνονται στις εικόνες είναι: L0 Ven → 2222 bp, 728 bp, L1 Cer/Ven → 4524 bp, 2189 bp.

## Συζήτηση

Η εργασία είχε ως σκοπό την εφαρμογή των αρχών της Συνθετικής Βιολογίας σε ένα τομέα της Βιολογίας φυτών που είναι πολύ σημαντικός, τόσο για τη βασική έρευνα, όσο και για εφαρμογές που αφορούν τον άνθρωπο. Ο εντοπισμός εξειδικευμένων μεταβολιτών με υψηλή ανάλυση και σε πραγματικό χρόνο, μπορεί να «ξεκλειδώσει» πολλά μυστικά της φυσιολογίας των φυτών και διαφόρων μηχανισμών τους οποίους δεν έχουμε ανακαλύψει. Οι βιοαισθητήρες τύπου FRET είναι μία πολύ καλή επιλογή ευαίσθητων αισθητήρων, οι οποίοι δεν απαιτούν ακριβό εξοπλισμό για την κατασκευή και τη μελέτη τους, αφού είναι βασισμένοι σε φθορίζουσες πρωτεΐνες.

Παρ' όλα αυτά, η εξερεύνηση της τεράστιας πολυπλοκότητας των δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών είναι ασύμβατη με τον τρόπο που γίνεται η κατασκευή τέτοιων αισθητήρων σήμερα, δηλαδή ξεχωριστά από κάθε ομάδα που θέλει να μελετήσει το βιοαισθητήρα. Η λύση που προτείνουμε, έγκειται στο FRET Acceptor biopart και στη



δυνατότητα – με την εκμετάλλευση της αυτοματοποίησης και της τυποποίησης των διαδικασιών – κατασκευής δεκάδων ή εκατοντάδων αισθητήρων σε μικρό χρονικό διάστημα και μαζικά. Για να αποδείξουμε την ευκολία του συστήματός μας, κατασκευάσαμε παλιούς αλλά και νέους αισθητήρες, για πρωτογενείς ή δευτερογενείς μεταβολίτες με ελάχιστο χρόνο κατασκευής τριών ημερών. Ακόμη, η διαδικασία είναι αρκετά απλή, από τον τυποποιημένο σχεδιασμό εκκινήτων, στην κατασκευή των αισθητήρων και τέλος στη μελέτη και το χαρακτηρισμό τους.

Εκτός όμως από τα θετικά του σχεδιασμού μας, υπήρχαν και υπάρχουν κάποια εμπόδια, τα οποία πρέπει να ξεπεραστούν. Αρχικά, ένα πρόβλημα που επηρέασε την επιτυχία των πειραμάτων ήταν η καταστολή έκφρασης των κατασκευών μέσω RNAi. Το μήκος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και η ομοιότητα μεταξύ δότη και δέκτη, οδηγούν στην παραγωγή siRNAs από τις φυτικές πολυμεράσες του RNA (RDR6, RNA dependent RNA polymerase 6), τα οποία οδηγούν στην αποδόμηση του mRNA του διαγονιδίου [78]. Μία παροδική λύση, είναι ο συν-μετασχηματισμός του βιοαισθητήρα με ένα φορέα έκφρασης p19 suppressor of silencing. Η απόδοση και λειτουργικότητα του συν-μετασχηματισμού είναι όμως μειωμένες, συγκριτικά με το μετασχηματισμό μόνο ενός φορέα. Έτσι, σε επόμενα πειράματά μας, θα χρησιμοποιήσουμε *rdr6* knockout μεταλλαγμένες σειρές, οι οποίες φαίνεται πως επιτρέπουν την έκφραση τέτοιων αισθητήρων στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* [79]. Υπάρχει ακόμη η δυνατότητα επιλογής φθορίζοντων πρωτεϊνών οι οποίες δεν είναι και οι δύο παράγωγα της GFP. Ένα παράδειγμα θα ήταν ο συνδυασμός της GFP και της πρωτεΐνης mCherry. Μία εναλλακτική λύση, είναι η προσθήκη μίας μεταγραφικής μονάδας του p19 suppressor of silencing στο φορέα έκφρασης του βιοαισθητήρα. Αυτό, σε αντίθεση με τα *rdr6* μεταλλάγματα, επιτρέπει στην έκφραση των βιοαισθητήρων και σε φυτά για τα οποία δεν υπάρχουν μεταλλαγμένες σειρές για τη συγκεκριμένη πολυμεράση. Τέτοια φυτά μπορεί να είναι φυτά μη-μοντέλα, για τα οποία δεν υπάρχουν ανεπτυγμένα εργαλεία γονιδιωματικής τροποποίησης, αλλά υπάρχει τρόπος παροδικής έκφρασής τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το φυτό *Trigonella foenum-graecum*, το οποίο είναι μία ισχυρή πηγή δευτερογενών εξειδικευμένων μεταβολιτών [80].

Άλλο ένα σημαντικό ζήτημα, είναι η δημιουργία ενός λειτουργικού βιοαισθητήρα για τη λουπεόλη, το οποίο είναι ο μεταβολίτης που επιλέξαμε για να αποδείξουμε την αρχή της λειτουργίας του συστήματός μας. Ο FSLupS, ο οποίος εκφράστηκε επιτυχώς, τόσο σε φυτά όσο και σε βακτήρια, φάνηκε να μην αλληλεπιδρά με διαφορετικές συγκεντρώσεις λουπεόλης. Επίσης, δεν φάνηκε αλλαγή στην αναλογία FRET μετά από προσθήκη ATP, το οποίο είναι γνωστό πως προσδένεται στην επικράτεια που επιλέξαμε για τον FSLupS. Αυτό μας οδηγεί σε τρεις υποθέσεις: 1) Η λουπεόλη δεν προσδένεται στη συγκεκριμένη επικράτεια, επομένως οφείλουμε να επιστρέψουμε στην *in silico* ανάλυση και να εντοπίσουμε άλλες πιθανές επικράτειες, 2) Η λουπεόλη προσδένεται, όμως δεν υπάρχει αλλαγή στη στερεοχημική διαμόρφωση, οπότε επιστρέφουμε ξανά στην *in silico* ανάλυση, και 3) Η λουπεόλη, όντας ένα υδροφοβικό μόριο, κατακρημνίζεται κατά την προσθήκη της στο υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης, οπότε και δε μπορεί να προσδεθεί και να προκαλέσει αλλαγή στη στερεοδιάταξη του βιομορίου. Ενώ τα αποτελέσματα του ATP είναι αποθαρρυντικά, δεν γνωρίζουμε αν το ATP και η λουπεόλη προσδένονται με τον ίδιο τρόπο στην επικράτεια. Είναι πιθανόν το ATP να μη προκαλεί αλλαγή, ενώ η λουπεόλη να προκαλεί. Παρ' όλα αυτά, το ATP είναι γνωστό πως προσδένεται στην επικράτεια και είναι υδροφιλικό,

επομένως ο βιοαισθητήρας FSLupS, σύμφωνα με τα απολέσματα μας, δεν είναι λειτουργικός. Έχοντας τα δεδομένα του πειράματος με το ATP, θεωρούμε πιο πιθανή τη δεύτερη υπόθεση.

Για να εξετάσουμε το ενδεχόμενο αυτό, δημιουργήσαμε τον FSLupL, όπου περιλαμβάνει όλη την επικράτεια κινάσης και περιέχει την περιοχή του FSLupS. Αυτό πιθανώς να δώσει τη δυνατότητα στην πρωτεΐνη να αλλάξει τη στερεοχημική διαμόρφωση μετά την πρόσδεση του ATP ή της λουπεόλης, εφόσον υπάρχει μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής πρωτεΐνης στον αισθητήρα FSLupL.

Επιπρόσθετα, είναι γνωστό πως εκτός από την επικράτεια πρόσδεσης, που έχει άμεση επιρροή στην πρόσδεση ή μη του μορίου και στην αλλαγή στη διαμόρφωση στο χώρο, σημαντικό ρόλο παίζουν τόσο ο συνδυασμός των φθορίζοντων πρωτεϊνών, όσο και οι συνδυαστικές αλληλουχίες. Στην εργασία αυτή, εξετάσαμε ένα ζεύγος FPs, καθώς και ένα ζεύγος linkers. Για να εξερευνήσουμε την επιρροή των τμημάτων αυτών στην τελική απόδοση του βιοαισθητήρα, στο μέλλον θα δημιουργηθεί μία βιβλιοθήκη με bio-parts, τα οποία θα περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς συμβατών για FRET FPs, καθώς και συνδυασμούς νέων linkers.

Στην αναζήτηση νέων επικρατειών πρόσδεσης, οι γενικοί κανόνες που λαμβάνουμε υπ' όψει μας είναι σχετικοί με τη λειτουργικότητά τους. Ιδανικά, χρειαζόμαστε επικράτειες στις οποίες οι μεταβολίτες προσδέονται, δεν είναι όμως ενεργές. Αυτό σημαίνει πως τα ένζυμα τα οποία δεσμεύουν και τροποποιούν τα τριτερπένια, όπως P450s ή κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) για τη λουπεόλη, δεν θα ήταν η πρώτη επιλογή. Το ζήτημα που ίσως προκύψει είναι η τροποποίηση των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη ενδοκυτταρικά, αν η επικράτεια που προσθέσουμε στον βιοαισθητήρα είναι ενεργή, κάτι που διαστρεβλώνει την τελική εικόνα που λαμβάνουμε. Οι ιδανικές επικράτειες πρόσδεσης, θα ήταν πρωτεΐνες που δεσμεύουν τους μεταβολίτες αλλά δεν τους τροποποιούν. Τέτοιες πρωτεΐνες μπορεί να είναι υποδοχείς, μεμβρανικοί μεταφορείς, ή γενικώς πρωτεΐνες στις οποίες οι μεταβολίτες δεσμεύονται αλλοστερικά. Η LSK1 που επιλέχθηκε για το βιοαισθητήρα λουπεόλης, βρίσκεται πιθανώς στην τελευταία κατηγορία.

Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, έχουμε στρέψει το ενδιαφέρον μας στη δημιουργία ενός αλγορίθμου με τη γλώσσα προγραμματισμού Python, ο οποίος θα χρησιμοποιεί γνωστά εργαλεία για δημιουργία εξειδικευμένων εκκινήτων, και θα εισάγει τις κατάλληλες overhang αλληλουχίες, ώστε να γίνεται απευθείας ένθεση μίας πιθανής επικρατειας στη φυτική και βακτηριακή μεταγραφική μονάδα του FRET Acceptor. Η δημιουργία ενός τέτοιου προγράμματος, το οποίο θα ήταν δωρεάν και προσβάσιμο στο διαδίκτυο, θα βοηθούσε πολύ στον εξορθολογισμό (streamlining) και την αυτοματοποίηση της διαδικασίας, μειώνοντας ταυτόχρονα την απαίτηση σε χρόνο από το χρήστη για χειροκίνητη κατασκευή εκκινήτων, καθώς και την μείωση του ανθρώπινου λάθους, που όπως φάνηκε και από αυτή την εργασία, είναι πολύ εύκολο να συμβεί.

Η μείωση του χρόνου που απαιτείται για την κατασκευή νέων βιοαισθητήρων είναι επίσης υψίστης σημασίας, εάν ο στόχος είναι η σάρωση δεκάδων ή εκατοντάδων πιθανών επικρατειών πρόσδεσης. Εκεί μπορεί να βοηθήσει η επιστήμη της ρομποτικής και η αξιόπιστη διαχείριση ρευστών. Το κόστος για την αγορά ενός ρομπότ που διαχειρίζεται πιάτα μικροτιτλοδότησης 96 ή 384 δεν είναι πια απαγορευτικό για ένα ερευνητικό εργαστήριο. Το σύστημα που έχουμε σχεδιάσει επιτρέπει την αυτοματοποίηση και επιτάχυνση της διαδικασίας, χωρίς ανθρώπινη επίβλεψη με τη χρήση τυποποιημένων πρωτοκόλλων που η

κοινότητα της Βιολογίας Φυτών χρησιμοποιεί εδώ και χρόνια. Ακόμη, η σάρωση της λειτουργικότητας των βιοαισθητήρων μπορεί να επιταχυνθεί από σύστημα ταχείας σάρωσης, όπως FACS ή κυκλώματα μικρορευστομηχανικής.

## Βιβλιογραφία

1. Bar-On, Y., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 115(25), 6506-6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115
2. Rates, S. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicol*, 39(5), 603-613. doi: 10.1016/s0041-0101(00)00154-9
3. Tiaz, L., Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. In: *Plant Physiology*, 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 283–308 (Chapter 13)
4. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1250–1318.
5. Wright, R., & Nemhauser, J. (2019). Plant Synthetic Biology: Quantifying the “Known Unknowns” and Discovering the “Unknown Unknowns”. *Plant Physiology*, 179(3), 885-893. doi: 10.1104/pp.18.01222
6. Vom Endt, D. (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?. *Phytochemistry*, 61(2), 107-114. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00185-1
7. Yoder, L., & Mahlberg, P. (1976). REACTIONS OF ALKALOID AND HISTOCHEMICAL INDICATORS IN LATICIFERS AND SPECIALIZED PARENCHYMA CELLS OF CATHARANTHUS ROSEUS (APOCYNACEAE). *American Journal Of Botany*, 63(9), 1167-1173. doi: 10.1002/j.1537-2197.1976.tb13202.x
8. Yamamoto, K., Takahashi, K., Mizuno, H., Anegawa, A., Ishizaki, K., & Fukaki, H. et al. (2016). Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 113(14), 3891-3896. doi: 10.1073/pnas.1521959113
9. Uslu, V., & 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
10. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8 (3), 303–313.
11. Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., & Sahena, F. et al. (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. Jones, W., & Kinghorn, A. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Natural Products Isolation*, 323-351. doi: 10.1385/1-59259-955-9:323
13. Saito, K., & Matsuda, F. (2010). Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology. *Annual Review Of Plant Biology*, 61(1), 463-489. doi: 10.1146/annurev-arplant.043008.092035
14. 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. *The Plant Journal*, 70(1), 39-50. doi: 10.1111/j.1365-313x.2012.04902.x
15. Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., & Jiang, L. (2013). Organelle pH in the Arabidopsis Endomembrane System. *Molecular Plant*, 6(5), 1419-1437. doi: 10.1093/mp/sst079
16. Swanson, S., Choi, W., Chanoca, A., & Gilroy, S. (2011). In Vivo Imaging of Ca<sup>2+</sup>, pH, and Reactive Oxygen Species Using Fluorescent Probes in Plants. *Annual Review Of Plant Biology*, 62(1), 273-297. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103832

17. Hernández-Barrera, A., Velarde-Buendía, A., Zepeda, I., Sanchez, F., Quinto, C., & Sánchez-Lopez, R. et al. (2015). Hyper, a Hydrogen Peroxide Sensor, Indicates the Sensitivity of the Arabidopsis Root Elongation Zone to Aluminum Treatment. *Sensors*, *15*(1), 855-867. doi: 10.3390/s150100855
18. De Col, V., Fuchs, P., Nietzel, T., Elsässer, M., Voon, C., & Candeo, A. et al. (2017). ATP sensing in living plant cells reveals tissue gradients and stress dynamics of energy physiology. *Elife*, *6*. doi: 10.7554/elife.26770
19. Li, W., Song, T., Wallrad, L., Kudla, J., Wang, X., & Zhang, W. (2019). Tissue-specific accumulation of pH-sensing phosphatidic acid determines plant stress tolerance. *Nature Plants*, *5*(9), 1012-1021. doi: 10.1038/s41477-019-0497-6
20. Waadt, R., Hitomi, K., Nishimura, N., Hitomi, C., Adams, S., Getzoff, E., & Schroeder, J. (2014). FRET-based reporters for the direct visualization of abscisic acid concentration changes and distribution in Arabidopsis. *Elife*, *3*. doi: 10.7554/elife.01739
21. Herud-Sikimic, O., Stiel, A., Ortega-Perez, M., Shanmugaratnam, S., Höcker, B., & Jürgens, G. (2020). Design of a biosensor for direct visualisation of auxin. *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.19.911735
22. Hilleary, R., Choi, W., Kim, S., Lim, S., & Gilroy, S. (2018). Sense and sensibility: the use of fluorescent protein-based genetically encoded biosensors in plants. *Current Opinion In Plant Biology*, *46*, 32-38. doi: 10.1016/j.pbi.2018.07.004
23. Jones, A., Grossmann, G., Danielson, J., Sosso, D., Chen, L., Ho, C., & Frommer, W. (2013). In vivo biochemistry: applications for small molecule biosensors in plant biology. *Current Opinion In Plant Biology*, *16*(3), 389-395. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.010
24. (2013). *Positioning Synthetic Biology to Meet the Challenges of the 21st Century*. Washington: National Academies Press.
25. Ellis, T., Adie, T., & Baldwin, G. (2011). DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, *3*(2), 109-118. doi: 10.1039/c0ib00070a
26. 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
27. Xie, Zongjie; Hall, Jeremy; McCarthy, Ian P.; Skitmore, Martin; Shen, Liyin (2016-02-01). "Standardization efforts: The relationship between knowledge dimensions, search processes and innovation outcomes". *Technovation*. Innovation and Standardization. 48-49: 69-78. doi:10.1016/j.technovation.2015.12.002
28. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), Enzyme supplement 5. *Eur. J. Biochem.* *264*, 610-650 (1999)
29. Beal, J., Goñi-Moreno, A., Myers, C., Hecht, A., Vicente, M., & Parco, M. et al. (2020). The long journey towards standards for engineering biosystems. *EMBO Reports*. doi: 10.15252/embr.202050521
30. Jessop-Fabre, M., & Sonnenschein, N. (2019). Improving Reproducibility in Synthetic Biology. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, *7*. doi: 10.3389/fbioe.2019.00018
31. Baldwin, C.Y.; Clark, K.B. (2000). "Chapter 3: What Is Modularity?". *Design Rules: The power of modularity*. MIT Press. pp. 63-92. ISBN 9780262024662.
32. 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
33. Schmidt, M., & de Lorenzo, V. (2012). Synthetic constructs in/for the environment: Managing the interplay between natural and engineered Biology. *FEBS Letters*, *586*(15), 2199-2206. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.022
34. Xia, P., Ling, H., Foo, J., & Chang, M. (2019). Synthetic genetic circuits for programmable biological functionalities. *Biotechnology Advances*, *37*(6), 107393. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.015
35. Qin, J., Zhou, Y., Krivoruchko, A., Huang, M., Liu, L., & Khoomrung, S. et al. (2015). Modular pathway rewiring of *Saccharomyces cerevisiae* enables high-level production of L-ornithine. *Nature Communications*, *6*(1). doi: 10.1038/ncomms9224
36. Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, *438*(7067), 449-453. doi: 10.1038/nature04342
37. Chao, R., Mishra, S., Si, T., and Zhao, H. (2017). Engineering biological systems using automated biofoundries. *Metab. Eng.* *42*, 98-108. doi: 10.1016/j.ymben.2017.06.003
38. Wheelwright, S., & Clark, K. (1994). Accelerating the Design-build-test Cycle for Effective Product Development. *International Marketing Review*, *11*(1), 32-46. doi: 10.1108/02651339410057509



39. Gill, R., Halweg-Edwards, A., Clauset, A., & Way, S. (2015). Synthesis aided design: The biological design-build-test engineering paradigm?. *Biotechnology And Bioengineering*, *113*(1), 7-10. doi: 10.1002/bit.25857
40. Canton, B., Labno, A., & Endy, D. (2008). Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nature Biotechnology*, *26*(7), 787-793. doi: 10.1038/nbt1413
41. Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., & de las Heras, A. et al. (2012). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D666-D675. doi: 10.1093/nar/gks1119
42. Martínez-García, E., Goñi-Moreno, A., Bartley, B., McLaughlin, J., Sánchez-Sampedro, L., & del Pozo, H. et al. (2020). SEVA 3.0: an update of the Standard European Vector Architecture for enabling portability of genetic constructs among diverse bacterial hosts. *Nucleic Acids Research*, *48*(6), 3395-3395. doi: 10.1093/nar/gkaa114
43. 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
44. Wurtzel, E., Vickers, C., Hanson, A., Millar, A., Cooper, M., & Voss-Fels, K. et al. (2019). Revolutionizing agriculture with synthetic biology. *Nature Plants*, *5*(12), 1207-1210. doi: 10.1038/s41477-019-0539-0
45. Hadadi, N., Hafner, J., Shajkofci, A., Zisaki, A., & Hatzimanikatis, V. (2016). ATLAS of Biochemistry: A Repository of All Possible Biochemical Reactions for Synthetic Biology and Metabolic Engineering Studies. *ACS Synthetic Biology*, *5*(10), 1155-1166. doi: 10.1021/acssynbio.6b00054
46. Milenko Tokic, Noushin Hadadi, Meric Ataman, Dário Neves, Birgitta E. Ebert, Lars M. Blank, Ljubisa Miskovic, Vassily Hatzimanikatis. Discovery and Evaluation of Biosynthetic Pathways for the Production of Five Methyl Ethyl Ketone Precursors. *ACS Synthetic Biology* **2018**, *7* (8) , 1858-1873. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00049
47. Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y., Antonovsky, N., Noor, E., & Zohar, Y. et al. (2019). Conversion of *Escherichia coli* to Generate All Biomass Carbon from CO<sub>2</sub>. *Cell*, *179*(6), 1255-1263.e12. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.009
48. Wright, R., & Nemhauser, J. (2019). Plant Synthetic Biology: Quantifying the “Known Unknowns” and Discovering the “Unknown Unknowns”. *Plant Physiology*, *179*(3), 885-893. doi: 10.1104/pp.18.01222
49. Patron, N. (2020). Beyond natural: synthetic expansions of botanical form and function. *New Phytologist*. doi: 10.1111/nph.16562
50. Hartley, J. (2000). DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, *10*(11), 1788-1795. doi: 10.1101/gr.143000
51. Gibson, D., Young, L., Chuang, R. et al (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
52. Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *Plos ONE*, *6*(2), e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765
53. Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E., Zandalinas, S., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *Plos ONE*, *6*(7), e21622. doi: 10.1371/journal.pone.0021622
54. Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *Plos ONE*, *3*(11), e3647. doi: 10.1371/journal.pone.0003647
55. 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
56. Patron, N., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., & Youles, M. et al. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNAParts. *New Phytologist*, *208*(1), 13-19. doi: 10.1111/nph.13532
57. Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *Plos ONE*, *6*(2), e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765

58. Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T., Werner, S., & Jones, J. et al. (2014). A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synthetic Biology*, 3(11), 839-843. doi: 10.1021/sb4001504
59. Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palaci, J., Castelijn, B., Forment, J., & Ziarsolo, P. et al. (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
60. Vazquez-Vilar, M., Quijano-Rubio, A., Fernandez-del-Carmen, A., Sarrion-Perdigones, A., Ochoa-Fernandez, R., & Ziarsolo, P. et al. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research*, gkw1326. doi: 10.1093/nar/gkw1326
61. Hsiao, A., & Kuo, M. D. (2009). High-throughput Biology in the Postgenomic Era. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 20(7), S488-S496. <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2009.04.040>
62. Lim, H., Jang, S., Jang, S., Seo, S., & Jung, G. (2018). Design and optimization of genetically encoded biosensors for high-throughput screening of chemicals. *Current Opinion In Biotechnology*, 54, 18-25. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.011
63. Yang, G., & Withers, S. (2009). Ultrahigh-Throughput FACS-Based Screening for Directed Enzyme Evolution. *ChemBiochem*, 10(17), 2704-2715. doi: 10.1002/cbic.200900384
64. Chiu, F., & Stavrakis, S. (2019). High-throughput droplet-based microfluidics for directed evolution of enzymes. *Electrophoresis*, 40(21), 2860-2872. doi: 10.1002/elps.201900222
65. Bunzel, H., Garrabou, X., Pott, M., & Hilvert, D. (2018). Speeding up enzyme discovery and engineering with ultrahigh-throughput methods. *Current Opinion In Structural Biology*, 48, 149-156. doi: 10.1016/j.sbi.2017.12.010
66. Naeem, A., James, N., Tanvir, M., Marriam, M., Nathaniel, S., (2017). Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS): An Advanced Cell Sorting Technique. *PSM Biol. Res.*, 2(2): 83-88
67. Cheng, Ping-Chin (2006). "The Contrast Formation in Optical Microscopy". In Pawley, James B. (ed.). *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed.). New York, NY: Springer. pp. 162-206. doi:10.1007/978-0-387-45524-2\_8. ISBN 978-0-387-25921-5.
68. Kenworthy, A. (2001). Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods*, 24(3), 289-296. doi: 10.1006/meth.2001.1189
69. Jares-Erijman, E., & Jovin, T. (2003). FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1387-1395. doi: 10.1038/nbt896
70. Prendergast FG, Mann KG (Aug 1978). "Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*". *Biochemistry*. 17 (17): 3448-53. doi:10.1021/bi00610a004
71. Aliye, N., Fabbretti, A., Lupidi, G., Tsekoa, T., & Spurio, R. (2014). Engineering color variants of green fluorescent protein (GFP) for thermostability, pH-sensitivity, and improved folding kinetics. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(3), 1205-1216. doi: 10.1007/s00253-014-5975-1
72. Frommer, W., Davidson, M., & Campbell, R. (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2833. doi: 10.1039/b907749a
73. Banerjee, S., Garcia, L., & Versaw, W. (2016). Quantitative Imaging of FRET-Based Biosensors for Cell- and Organelle-Specific Analyses in Plants. *Microscopy And Microanalysis*, 22(2), 300-310. doi: 10.1017/s143192761600012x
74. [Homeostasis in Nuclei of COS-7 Cells. *Journal Of Fluorescence*, 14(5), 603-609. doi: 10.1023/b:jofl.0000039347.94943.99
75. 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](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.143).
76. Margareth B. C. Gallo; Miranda J. Sarachine (2009). "Biological activities of Lupeol". *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3 (Special Issue 1): 46-66
77. Garagounis, C., Tsikou, D., Plitsi, P., Psarrakou, I., Avramidou, M., & Stedel, C. et al. (2019). Lotus SHAGGY-like kinase 1 is required to suppress nodulation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 98(2), 228-242. doi: 10.1111/tpj.14207
78. Vaucheret, H. (2005). MicroRNA-Dependent Trans-Acting siRNA Production. *Science Signaling*, 2005(300), pe43-pe43. doi: 10.1126/stke.3002005pe43





79. Deuschle, K., Chaudhuri, B., Okumoto, S., Lager, I., Lalonde, S., & Frommer, W. (2006). Rapid Metabolism of Glucose Detected with FRET Glucose Nanosensors in Epidermal Cells and Intact Roots of Arabidopsis RNA-Silencing Mutants. *The Plant Cell*, *18*(9), 2314-2325. doi: 10.1105/tpc.106.044073
80. Garagounis, C., Beritza, K., Georgopoulou, M., Sonawane, P., Haralampidis, K., & Goossens, A. et al. (2020). A hairy-root transformation protocol for *Trigonella foenum-graecum* L. as a tool for metabolic engineering and specialised metabolite pathway elucidation. *Plant Physiology And Biochemistry*, *154*, 451-462. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.06.011
81. 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, *Microscopy research and technique*. *69*, 941-56.
82. Maekawa, T., Kusakabe, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Murooka, Y. & Hayashi, M. (2007) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*, *Molecular Plant Pathogen Interactions*. **21**, 375-382.
83. Yamao M *et al.* (2016) Two New FRET Imaging Measures: Linearly Proportional to and Highly Contrasting the Fraction of Active Molecules. *PLOS ONE* **11**(10): e0164254.