



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανάπτυξη Διαγνωστικής Μεθόδου
για την Ανίχνευση Ιικών Λοιμώξεων
μέσω του Μηχανισμού Toehold Switch

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Λίτσα Μαρία

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Τόπακας Ευάγγελος

Αθήνα, Ιούνιος 2019

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka” but “That's funny”.

- Isaac Asimov

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, από τον Μάιο του 2018 έως και τον Ιούνιο του 2019. Αποτελεί προσπάθεια υλοποίησης και βελτίωσης του πρότζεκτ “genoMERS”, που σχεδιάστηκε από την ομάδα iGEM Athens 2018, στο πλαίσιο του παγκόσμιου διαγωνισμού συνθετικής βιολογίας iGEM 2018. Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, σε αυτό το σημείο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., ο οποίος δέχτηκε να επιβλέψει τη διπλωματική μου ως υπεύθυνος καθηγητής, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε σε εμένα και την ομάδα iGEM Athens 2018 στα πρώτα στάδια σχεδιασμού του πρότζεκτ μας. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κέκο, καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αμφότεροι ο κ. Τόπακας και ο κ. Κέκος ενέπνευσαν σημαντικά το ενδιαφέρον που ανέπτυξα για την έρευνα στον τομέα της Βιοτεχνολογίας, και δεν μπορώ παρά να τους ευχαριστήσω που υπήρξαν ανάμεσα στα πιο καθοριστικά ερεθίσματά μου στην πορεία αυτή.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Πελαγία Φωκά, ερευνήτρια του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. για την υποστήριξή της καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Οφείλω να την ευχαριστήσω για την αγάπη που έδειξε για τη δουλειά μου, για την πίστη της στις δυνατότητές μου, για το αστείρευτο ενδιαφέρον της για την εξέλιξή μου και για τις πολύτιμες συμβουλές που ήταν πάντοτε πρόθυμη να μου δώσει.

Από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τον κ. Πέτρο Ηλιάδη που καλλιέργησε το ερευνητικό μου ενδιαφέρον και με βοήθησε με πρακτικές συμβουλές, καθώς είχα την ευχαρίστηση και την τύχη να δουλέψω στενά μαζί του στο πλαίσιο τόσο της πρακτικής μου άσκησης όσο και της διπλωματικής μου. Επιπροσθέτως, να μεταφέρω τις ευχαριστίες μου στην κ. Ειρήνη, την κ. Ράνια και τον κ. Θάνο, καθένας εκ των οποίων συνέβαλε με την εμπειρία του στην θεμελίωση των επιστημονικών βάσεων της παρούσας εργασίας, και, ακόμη, στην Εύη, τη Βανέσσα και τη Γεωργία που στελέχωναν το εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας και αποτελούσαν καθημερινή συντροφιά σε αυτό το ταξίδι.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα iGEM Athens 2018, της οποίας αποτέλεσα μέλος ως επικεφαλής του Wet Lab από τον Δεκέμβριο του 2017 έως τον Νοέμβριο του 2018, για το έναυσμα που μου έδωσε ώστε να ανακαλύψω την αγάπη μου για τον τομέα της συνθετικής βιολογίας, αλλά και για τη δημιουργία της βάσης για αυτή την εργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Βασίλη Κρόκο για το ρόλο του στον *in silico* σχεδιασμό του μηχανισμού που αποτελεί το αντικείμενο

ενδιαφέροντος της παρούσας εργασίας, την Έλενα Κωσταδήμα που έκανε λιγότερο κουραστικές τις πολύωρες εργαστηριακές μας βάρδιες και τη Λήδα Κατωπόδη για τη συντροφιά και την υποστήριξή της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα πρέπει να δοθεί στην οικογένεια και τους φίλους μου, χωρίς την έμπρακτη και ηθική υποστήριξη των οποίων η πραγμάτωση του στόχου αυτού θα ήταν αδύνατη.

Περίληψη

Ο Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) είναι ένας ιός με ποσοστό θνησιμότητας ~35%, που θεωρείται ένας από τους πιο πιθανούς υπεύθυνους για πρόκληση μελλοντικής επιδημίας. Ο στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μίας καινοτόμου μεθόδου για την ανίχνευση του MERS-CoV.

Η μέθοδος που προτείνεται στην εργασία βασίζεται στο μηχανισμό των ριβοδιακοπών φουρκέτας (toehold switches). Τα toehold switches είναι μόρια mRNA με λειτουργία ριβοδιακόπτη. Εν προκειμένω, οι ριβοδιακόπτες που σχεδιάστηκαν ρυθμίζουν την έκφραση της τρεχαλάσης, ενός ενζύμου που υδρολύει το δισακχαρίτη τρεχαλόζη σε γλυκόζη και λειτουργεί ως ο μάρτυρας του συστήματος. Η έκφραση της τρεχαλάσης επιτρέπεται μόνο όταν ο ιός είναι παρών στο δείγμα. Έτσι συνολικά, το ιικό φορτίο στο δείγμα ενεργοποιεί την παραγωγή γλυκόζης, η οποία ποσοτικοποιείται μέσω ενός συμβατικού εμπορικού μετρητή σακχάρου, σημαίνοντας τη διάγνωση. Ως εναλλακτικό σύστημα μάρτυρα, προτείνεται επίσης η κλασμάτωση της τρεχαλάσης σε δύο τμήματα. Αυτό το σύστημα μειώνει τη δομική πολυπλοκότητα των toehold switches και αναμένεται να μειώσει τον απαιτούμενο χρόνο για διάγνωση. Τα δύο τμήματα ενώνονται μεταξύ τους δομώντας το λειτουργικό ένζυμο μέσω αλληλεπιδράσεων φερμουάρ λευκίνης. Αυτή η επανένωση ωστόσο δεν ελέγχθηκε πειραματικά.

Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας, σχεδιάστηκε *in silico* κάθε πιθανό toehold switch για την ειδική ανίχνευση του MERS-CoV και τα τέσσερα εξ αυτών που παρουσίασαν βέλτιστο θερμοδυναμικό προφίλ επιλέχθηκαν για *in vitro* έλεγχο της λειτουργικότητάς τους. Για την κατασκευή του μοριακού μηχανισμού, επιλέχθηκαν δύο καινοτόμες μέθοδοι κλωνοποίησης, ευρέως χρησιμοποιούμενες στον τομέα της συνθετικής βιολογίας – το Gibson Assembly και το Restriction Free Cloning. Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των toehold switches και η δεύτερη για την κλωνοποίηση των trigger RNAs. Η επιτυχία των δύο μεθόδων επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχισης DNA. Απεδείχθη πως τα toehold switches που ελέγχθηκαν κατόρθωσαν να καταστείλουν τη μετάφραση της πρωτεΐνης-μάρτυρα στην ON κατάστασή τους. Ωστόσο, παρουσία του αντίστοιχου trigger RNA τους, δε μεταβήκαν στην κατάσταση OFF. Τέλος, προσομοιώνοντας τη συμπεριφορά ενός toehold switch σε κατάσταση OFF, δείξαμε πως ο προτεινόμενος διαγνωστικός μηχανισμός απαιτεί περίπου 69 λεπτά ώστε να δώσει το σήμα της τελικής διάγνωσης.

Abstract

Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) is a virus with ~35% mortality rate, considered to be one of the most likely to cause major epidemics. The aim of the present diploma thesis is the development of a novel method for the detection of MERS-CoV.

The engineered method is based on the toehold switch mechanism. Toehold switches are mRNA molecules with riboswitch functionality. In this case, the designed switches regulate the expression of trehalase, an enzyme which hydrolyzes the disaccharide trehalose to glucose and acts as the reporter of the system. Trehalase expression is allowed only when the virus is present in the sample. Thus, overall, the viral load in the sample triggers glucose production, which is measured by a common commercial glucometer, signaling the diagnosis. An alternative reporter system, an engineered split trehalase, was also proposed. This system lowers the structural complexity of the toehold switches, which is considered to accelerate the diagnosis. The two split fragments assemble to a functional enzyme through leucine zipper interactions. Nevertheless, the reassembly of the enzyme was not experimentally tested.

In the frame of this diploma thesis, every single toehold switch for the specific detection of MERS-CoV was designed *in silico* and the four ones presenting optimum thermodynamic profiles were chosen for *in vitro* testing of their functionality. For the construction of the molecular mechanism, we chose to use two novel cloning techniques, widely used in the field of synthetic biology; Gibson Assembly and Restriction Free Cloning. Gibson Assembly was utilized for the cloning process of the toehold switches and Restriction Free Cloning cloning was used for the cloning process of the trigger RNAs. The success of the cloning processes was validated through DNA sequencing. We proved that the tested toehold switches were able to repress the translation of the reporter protein in their ON state (toehold structure). However, in the presence of their corresponding trigger RNAs, the switches did not transition to their OFF state (linear structure). Finally, simulating a toehold switch on its OFF state, we demonstrated that the proposed diagnostic mechanism demands about 69 minutes of reaction time in order to give the final diagnosis signal.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	i
Περίληψη	iii
Abstract	iv
Μέρος Α. Θεωρητικό Υπόβαθρο	1
Κεφάλαιο Α.1. Εισαγωγή	1
Α.1.1 Ταξιδιωτική Ιατρική	1
Α.1.2 Ο ιός MERS-CoV	2
Α.1.3 Το γονιδίωμα του ιού	3
Α.1.4 Κλινικά Χαρακτηριστικά	3
Α.1.5 Τεχνικές Διάγνωσης	4
Α.1.6 Επιδημιολογία	4
Α.1.7 Θεραπεία Και Πρόληψη	5
Κεφάλαιο Α.2. Συνθετική Βιολογία και Toehold Switches	6
Α.2.1 Γέννηση Και Εξέλιξη Της Συνθετικής Βιολογίας	6
Α.2.2 Ριβοδιακόπτες και RNA-βιοαισθητήρες	8
Α.2.3 Toehold Switches	9
Α.2.4 RNA-Βιοαισθητήρες Επί Χάρτου	10
Α.2.5 Πρωτεΐνη-Μάρτυρας	11
Α.2.6 Η Τρεχαλάση Ως Πρωτεΐνη-Μάρτυρας	12
Α.2.7 Ανίχνευση Γλυκόζης	13
Κεφάλαιο Α.3. Κατασκευή Πλασμιδίων	15
Α.3.1 Συμβατική Ένωση Τμημάτων DNA (DNA Ligation)	15
Α.3.2 Καινοτόμοι Μέθοδοι Κατασκευής Πλασμιδίων	16
Α.3.3 Η μέθοδος του Gibson Assembly	16
Α.3.3 Restriction Free Cloning - RFC	17
Στόχος της Εργασίας	19
Μέρος Β. Υλικά & Μέθοδοι	21
Β.1 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells) <i>E. coli</i>	21
Β.2 Μετασχηματισμός (transformation) δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	21

B.3	Απομόνωση ολικού (γενωμικού και πλασμιδιακού) DNA βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> BL21 μέσω χρήσης του Quick-DNATM Miniprep Kit (Zymo Research)	22
B.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Miniprep).....	23
B.5	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία / μεγάλη κλίμακα (Midiprep / Maxiprep) μέσω χρήσης του QIAGEN® Plasmid Purification kit.....	24
B.6	Απομόνωση και καθαρισμός τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης μέσω χρήσης του Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs).....	25
B.7	Συγκέντρωση DNA με κατακρήμνιση αιθανόλης	25
B.8	Καθαρισμός DNA.....	26
B.9	Ενζυματική πέψη DNA.....	26
B.10	Ένωση φορέα κλωνοποίησης και ενθέματος με χρήση T4 DNA λιγάσης	27
B.11	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	28
B.12	Αντίδραση Gibson Assembly μέσω του Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs).....	30
B.13	In vitro μεταγραφή και μετάφραση μέσω του PURExpress® In Vitro Protein Synthesis kit (New England Biolabs)	31
B.14	Ενζυμική αντίδραση τρεχαλάσης.....	31
B.15	Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω της μεθόδου DNS	31
B.16	Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω του αντιδραστηρίου Benedict's	32
B.17	Σχεδιασμός του Gibson Assembly.....	32
Μέρος Γ. Αποτελέσματα		33
Γ.1	In silico σχεδιασμός των toehold switches και trigger RNAs	33
Γ.2	Κλωνοποίηση.....	35
Γ.2.1	Απομόνωση των γονιδίων TreA, TreA-a & TreA-b.....	35
Γ.2.2	Κλωνοποίηση της TreA μέσω ligation	35
Γ.2.3	Κλωνοποίηση της TreA-b / zipper-b μέσω Gibson Assembly	38
Γ.2.4	Κλωνοποίηση των toehold switches με TreA-a ως πρωτεΐνη-μάρτυρα	38
Γ.2.5	Κλωνοποίηση των toehold switches με TreA ως πρωτεΐνη-μάρτυρα	40
Γ.2.6	Κλωνοποίηση των trigger RNAs	41
Γ.2.7	Αλληλούχιση DNA	42
Γ.3	Ενζυμική δραστηριότητα τρεχαλάσης	43
Γ.3.1	Επιλογή μεθόδου πειραματικού προσδιορισμού γλυκόζης	43
Γ.3.2	Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.....	44
Γ.3.3	Πρόβλεψη κατώτατου χρονικού ορίου διάγνωσης	44
Γ.4	Έλεγχος λειτουργικότητας των toehold switches	46
Μέρος Δ. Συμπεράσματα		47
Δ.1	Τεχνικές κλωνοποίησης.....	47

Δ.2	Μηχανισμός των toehold switches	48
Δ.3	Η τρεχαλάση ως πρωτεΐνη-μάρτυρας στο μηχανισμό toehold switch	48
Δ.4	Λήψη διάγνωσης μέσω εμπορικού γλυκομέτρου	49
Βιβλιογραφία.....		51
Παράρτημα I: Χάρτες Πλασμιδίων		57
Παράρτημα II: Γονιδιακές Ακολουθίες		62
Παράρτημα III: Εκκινητές		63
Παράρτημα IV: Πίνακας Συντημήσεων		65

Μέρος Α

Θεωρητικό Υπόβαθρο

Κεφάλαιο Α.1

Εισαγωγή

Στις 17 Δεκεμβρίου 1903, οι αδερφοί Ράιτ πραγματοποίησαν την πρώτη επιτυχημένη αεροπορική πτήση στην ιστορία. Η πτήση διήρκησε 12 δευτερόλεπτα και κάλυψε απόσταση περίπου 35 μέτρων. Λίγες ημέρες αργότερα, ο Όρβιλ Ράιτ δήλωσε πως “καμία ιπτάμενη μηχανή δε θα κατορθώσει ποτέ να πετάξει από τη Νέα Υόρκη ως το Παρίσι” [1]. Σήμερα, έναν αιώνα αργότερα, μία τέτοια πτήση θεωρείται ταξίδι ρουτίνας. Οι παγκόσμιες μετακινήσεις έχουν πλέον καταστεί πολύ ευκολότερες και προσβάσιμες, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τουρισμού να καταγράφει 1,4 δισεκατομμύρια διεθνείς αφίξεις ταξιδιωτών σε όλο τον κόσμο για το έτος 2018 [2]. Με μία πρώτη ανάγνωση, είναι εύκολο να διακρίνει κανείς τα πολυάριθμα κοινωνικά και πολιτισμικά οφέλη που προκύπτουν από αυτό το φαινόμενο. Ποιο είναι ωστόσο το αντίκτυπο στην παγκόσμια υγεία;

A.1.1 Ταξιδιωτική Ιατρική

Από την αρχαιότητα, τα καραβάνια και οι πολεμικές εκστρατείες μετέφεραν ασθένειες από πόλη σε πόλη και από χώρα σε χώρα. Τα σύγχρονα συστήματα μεταφορών διευκολύνουν αυτή τη διαδικασία, καθιστώντας την παγκόσμια εξάπλωση ασθενειών εξαιρετικά γρηγορότερη. Με αυτή τη βάση, από την δεκαετία του 1980, ξεκίνησε μία προσπάθεια μελέτης πάνω στις αρχές και τις συστάσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την προστασία της υγείας του ταξιδιώτη. Έτσι γεννήθηκε η ταξιδιωτική ιατρική. Η ταξιδιωτική ιατρική αποτελεί τον τομέα φροντίδας υγείας που ασχολείται κυρίως με την πρόληψη των νοσημάτων που αφορούν τον ταξιδιώτη, και κατά δεύτερο λόγο, με την εκτίμηση και αντιμετώπιση του ταξιδιώτη που νοσεί μετά την επιστροφή του. Κατ' επέκταση, αποτελεί τομέα της δημόσιας υγείας, δεδομένης της εμπλοκής της στη διαχείριση εισαγόμενων νοσημάτων [3].

Ο κίνδυνος των ταξιδιωτών να μολυνθούν από κάποιο λοιμώδες νόσημα δεν είναι αμελητέος, αφού τα λοιμώδη νοσήματα ευθύνονται για τις μισές περίπου νοσήσεις και θανάτους στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες. Έχει υπολογιστεί ότι το 45% έως 70% των Αμερικανών που ταξιδεύουν στις αναπτυσσόμενες χώρες παρουσιάζει κάποια μη θανατηφόρο λοιμώδη ασθένεια, με πιο συχνές τη

διάρροια των ταξιδιωτών και τις λοιμώξεις του αναπνευστικού. Ο κίνδυνος ενός ταξιδιώτη εξαρτάται από τη χώρα που επισκέπτεται, την περιοχή της χώρας (αστική ή αγροτική), την εποχή, τις συνθήκες διαμονής, τη διάρκεια της επίσκεψης, την κατάσταση του ανοσοποιητικού του συστήματος και την αποτελεσματικότητα των μέτρων πρόληψης [4].

Στο πλαίσιο αυτό, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) το 2015 κοινοποίησε μία λίστα παθογόνων που θεωρούνται οι πιθανότεροι να προκαλέσουν σοβαρές επιδημίες στο εγγύς μέλλον και για τους οποίους υπάρχουν λίγα ή καθόλου ιατρικά μέτρα αντιμετώπισης [5]. Στην τρίτη θέση αυτής της λίστας εμφανίζεται ο ιός MERS-CoV.

A.1.2 Ο ιός MERS-CoV

Ο Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) είναι ένας RNA ιός θετικής πολικότητας (+ssRNA) που ανήκει στο γένος *Betacoronavirus* [6]. Το πρώτο περιστατικό του MERS-CoV σημειώθηκε στη Τζέντα της Σαουδικής Αραβίας τον Ιούνιο του 2012, όπου ένας ασθενής παρουσίασε οξεία πνευμονία και νεφρική ανεπάρκεια. Ο ιός είναι ενδημικός στην ευρύτερη περιοχή της Μέσης Ανατολής. Ωστόσο, από το 2012, έχουν αναφερθεί πολυάριθμα περιστατικά εκτός της περιοχής της Μέσης Ανατολής, στη Βόρεια Αμερική, την Ασία (Κίνα, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Δημοκρατία της Κορέας και Ταϊλάνδη) και την Ευρώπη (Αυστρία, Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ιταλία, Κάτω Χώρες, Τουρκία και Ηνωμένο Βασίλειο). Μάλιστα, ασθενής που πέταξε από τη Σαουδική Αραβία στη Δημοκρατία της Κορέας το 2015 αποτέλεσε την αιτία πρόκλησης της δεύτερης μεγαλύτερης επιδημίας MERS, με εμφάνιση 186 νοσοκομειακών περιστατικών, κυρίως μέσω νοσοκομειακής μετάδοσης.

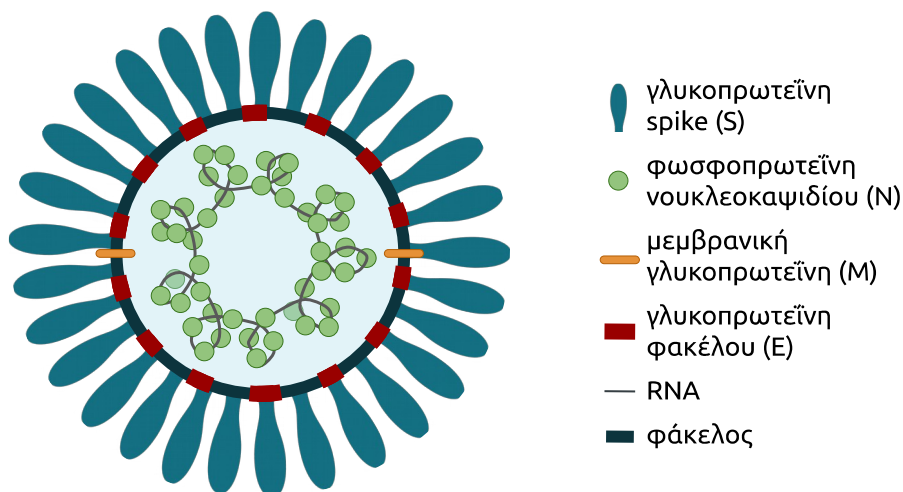
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [6], από το 2012, έχουν καταγραφεί 2.428 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα περιστατικά ασθενών με MERS, σε 27 χώρες, με 838 (~35%) εκ των περιστατικών αυτών να έχουν καταλήξει σε θάνατο. Με βάση τα παραπάνω γίνονται καταφανείς οι λόγοι για τους οποίους ο εν λόγω ιός βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας της ταξιδιωτικής ιατρικής.

ΠΙΝΑΚΑΣ Α.1.1: Αριθμός περιστατικών και θανάτων λόγω του MERS-CoV στους πρώτους 1611 ασθενείς του, ως το 2016, στις χώρες με τα περισσότερα θύματα [7].

Χώρα	Αριθμός Περιστατικών	Αριθμός Θανάτων
Σαουδική Αραβία	1255	539 (43%)
Νότια Κορέα	185	36 (19.5%)
Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα	81	11 (13.6%)
Ιορδανία	35	14 (40%)
Κατάρ	13	5 (38.5%)
Παγκόσμια	1611	275 (35.7%)

A.1.3 Το γονιδίωμα του ιού

Ο MERS-CoV έχει γονιδίωμα 30119 νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει επτά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames – ORFs) (1a, 1b, 3, 4a, 4b, 5, 8b) και τέσσερα δομικά γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη τύπου ροπαλού (spike – S), το νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid – N), μεμβρανικές πρωτεΐνες (membrane – M) και πρωτεΐνες του φακέλου (envelope – E) [8]. Τα αλληλεπικαλυπτόμενα ORF1a και 1b καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματός του και μεταφράζονται σε πολυπρωτεΐνες που διασπώνται εν συνεχεία από ιικές πρωτεάσες για να δώσουν δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες (non-structural proteins – NSPs). Αυτές σχηματίζουν το σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής του ιού [9].



ΕΙΚΟΝΑ A.1.1: Μορφολογία και δομή του MERS-CoV

Οι NSPs, SPs, M, E, N, S και άλλες πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και ένζυμα αναλαμβάνουν ως επί το πλείστον τη διεκπεραίωση της λοιμογόνου δράσης του ιού. Χαρακτηριστικά, η πρωτεΐνη E είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση των σωματιδίων του ιού στους υποδοχείς των κυττάρων-ξενιστών, ενώ η πρωτεΐνη S στην επιφάνεια του ιού αναλαμβάνει το ρόλο του “καμουφλάζ” για να γίνει εφικτή η είσοδος του στο αναπνευστικό επιθήλιο, χωρίς να γίνει αντιληπτή από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή [10].

A.1.4 Κλινικά Χαρακτηριστικά

Το φάσμα των συμπτωμάτων στα άτομα με λοίμωξη από τον MERS-CoV κυμαίνεται από ασυμπτωματική μόλυνση ή ήπια ασθένεια που ομοιάζει με γρίπη, σε σοβαρή πνευμονία συνοδευόμενη από σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), σηπτικό σοκ, ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων, έως ακόμη και θάνατο. Η πορεία της λοίμωξης είναι πιο έντονη μεταξύ των

ατόμων σε ανοσοκαταστολή, καθώς και των ασθενών με ιατρικές παθήσεις, με κυριότερες τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, τις καρδιακές παθήσεις και τον διαβήτη [11].

Η ασθένεια ξεκινά από πυρετό και βήχα, πονόλαιμο, ρίγη, αρθραλγία και μυαλγία, ακολουθούμενη σύντομα από δύσπνοια, που εξελίσσεται ταχέως σε σοβαρή πνευμονία. Περίπου το ένα τρίτο των περιπτώσεων παρουσιάζουν επίσης γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως διάρροια και εμετό. Χρονικά, η πορεία της ασθένειας είναι σχετικά μικρή, με την ασθένεια να προχωράει ταχέως μέσω διαφόρων σταδίων περί τις 7 έως 11 ημέρες μετά τη μόλυνση. Όπως συμβαίνει και με άλλους ανθρώπινους κορονοϊούς, ο MERS-CoV υπερπηδά το φράγμα της έμφυτης ανοσοαπόκρισης του ξενιστή και προκαλεί ταχεία δυσλειτουργία στις οδούς της κυτταρικής μεταγραφής. Το αποτέλεσμα είναι η ραγδαία απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων, σε πολύ μεγαλύτερη έκταση από ό,τι στην περίπτωση του συγγενή κορονοϊού SARS [7].

A.1.5 Τεχνικές Διάγνωσης

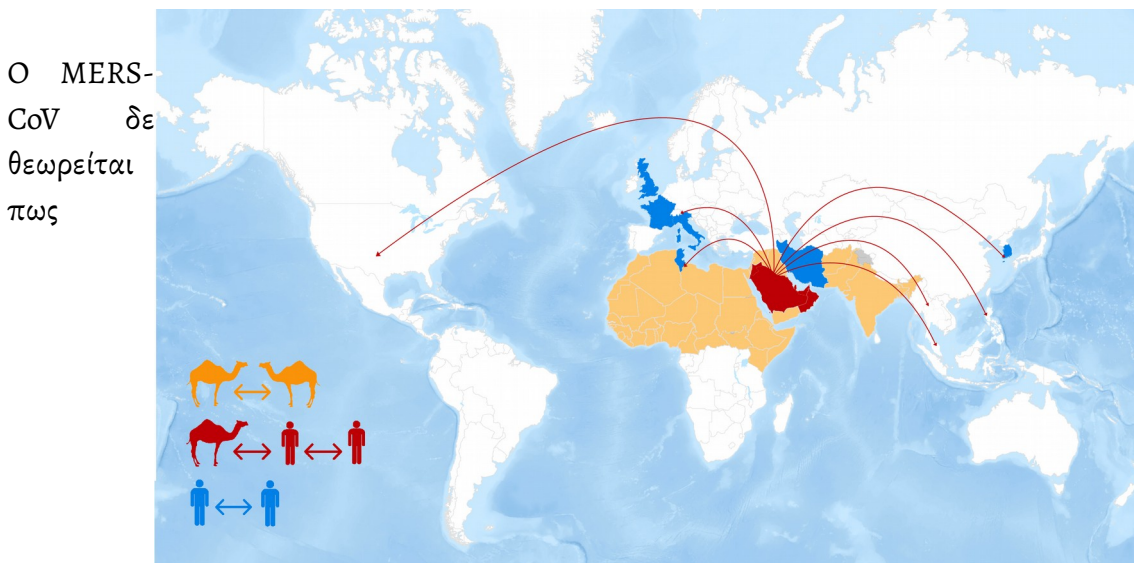
Η έγκαιρη διάγνωση για τους ασθενείς που πάσχουν από MERS και η ταχεία μοριακή εξέταση μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας δοκιμασία αντίστροφης μεταγραφής - ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός σταδίου (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – RT-qPCR). Η δοκιμή RT-qPCR μπορεί να διεξαχθεί σε δείγμα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, πτύελα και τραχειακό έκπλυμα. Ο ιός εντοπίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο αίμα, στα ούρα και στα κόπρανα, καθιστώντας ανέφικτη τη διάγνωσή του με ένα λιγότερο επεμβατικό δείγμα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνιστά την RT-qPCR για τη διάγνωση του MERS-CoV σε κλινικά δείγματα [12].

A.1.6 Επιδημιολογία

Συγγενικοί του MERS-CoV ιοί έχουν βρεθεί σε νυχτερίδες. Μάλιστα, αλλαγή δύο αμινοξέων στην πρωτεΐνη S ενός από αυτούς τους ιούς επιτρέπει την ενεργοποίησή του από ανθρώπινες πρωτεάσες και τη μόλυνση ανθρώπινων κυττάρων. Αυτό υποδηλώνει ένα πιθανό μηχανισμό με τον οποίο ο ιός κατόρθωσε να μεταβεί από νυχτερίδες σε ανθρώπους [13].

Οι καμήλες θεωρούνται ως ενδιάμεσοι ξενιστές και ως κύρια πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο, ενώ επίσης κατέχουν ρόλο “επωαστήρα” για τη διευκόλυνση δημιουργίας μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του ιού. Όταν δύο διαφορετικά στελέχη MERS-CoV, από δύο διαφορετικές πηγές, μολύνουν μία καμήλα, αυτά τα δύο γενετικά διαφορετικά στελέχη ανταλλάσσουν γενετικό υλικό με αποτέλεσμα τη μεταλλαξιγένεση και την ανάπτυξη νέων υποτύπων του MERS-CoV. Τα χαρακτηριστικά αυτών των νέων υποτύπων του MERS-CoV έχουν νέα αντιγόνα και νέα γονίδια που ρυθμίζουν τη λοιμογόνο δράση του ιού. Αυτή η “ρευστότητα” του ιικού γονιδιώματος έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή

απαίτηση νέων αντιγονικών στόχων για την ανίχνευσή του, οδηγώντας σε δυσκολίες για την ανάπτυξη εμβολίων και θεραπευτικών παρεμβάσεων [14]. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μετάδοσης του ιού από τις καμήλες στον άνθρωπο δεν είναι ξεκάθαρος.



ΕΙΚΟΝΑ Α.1.2: Μετάδοση και γεωγραφική εξάπλωση του MERS-CoV [6]

μεταδίδεται εύκολα από άνθρωπο σε άνθρωπο. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των νοσοκομειακών περιστατικών προκύπτουν από μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, εξ επαφής, σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης.

A.1.7 Θεραπεία Και Πρόληψη

Μέχρι σήμερα, οι έρευνες για τη θεραπεία του MERS έχουν καταφέρει να γίνουν αποτελεσματικές μόνο σε υποστηρικτικό βαθμό, για μερικό κατευνασμό των συμπτωμάτων. Η χρήση αντιικών για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου ακατάσχετης μόλυνσης είναι μία από τις κοινές πρακτικές πρόληψης. Οι προσπάθειες για πλήρη έλεγχο της αναπνευστικής δυσφορίας και της πνευμονικής ίνωσης μέσω της χρήσης κορτικοστεροειδών ήταν ωστόσο ανεπιτυχείς [7].

Η πρόληψη της μόλυνσης απαιτεί την αποφυγή της έκθεσης σε καμήλες. Αυτό συνεπάγεται ακόμη την αποφυγή κατανάλωσης ακατέργαστου γάλακτος καμήλας και ανεπαρκώς μαγειρεμένου κρέατος, ιδιαίτερα για άτομα με διαβήτη, χρόνια πνευμονική νόσο, νεφρική δυσλειτουργία, ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς ή ηλικιωμένους. Τα επιβεβαιωμένα περιστατικά θα πρέπει να απομονώνονται για να αποφευχθεί η διάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Κεφάλαιο Α.2

Συνθετική Βιολογία και Toehold Switches

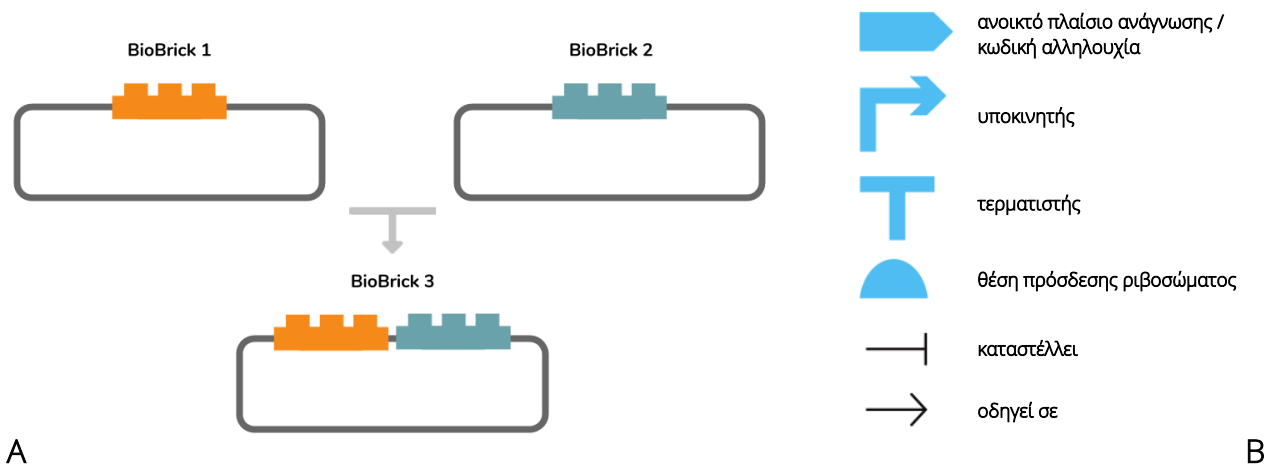
Ο ορθολογικός σχεδιασμός βιολογικών συστημάτων και η μηχανική των κυττάρων έχουν υπάρξει αντικείμενο έρευνας από τους ερευνητές των κλάδων της βιολογίας και της μηχανικής εδώ και δεκαετίες. Ως πρώτο βήμα, οι τεχνολογίες ανασυνδυασμένου DNA που αναπτύχθηκαν στη δεκαετία του 1970 κατέστησαν εφικτή όχι μόνο την μηχανική κυττάρων και την κατασκευή νέων βιολογικών λειτουργιών, αλλά και την “κατάλυση” την κατανόησης των φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Τα τελευταία 10 χρόνια, βασικές καθοριστικές τεχνολογίες για την κυτταρική μηχανική, όπως η αλληλούχιση γονιδιώματος και η σύνθεση, έγιναν λιγότερο δαπανηρές και πιο προσιτές σε ερευνητές σε όλο τον κόσμο. Με βάση αυτές τις τεχνικές ανακαλύψεις, η συνθετική βιολογία, ένας νέος κλάδος που χρησιμοποιεί τις αρχές της μηχανικής ως κατευθυντήριες γραμμές για τη βιολογική έρευνα, γεννήθηκε με σκοπό να τροποποιήσει υπάρχοντα βιολογικά συστήματα, αλλά και για να δημιουργήσει νέα [15].

Α.2.1 Γέννηση Και Εξέλιξη Της Συνθετικής Βιολογίας

Το 2000, δημιουργήθηκαν τα πρώτα γενετικά κυκλώματα, το toggle switch [16] και το oscillating network [17]. Και τα δύο κυκλώματα αποτελούνταν από γνωστά λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία του DNA και κατασκευάστηκαν με βάση απλά μαθηματικά μοντέλα. Αυτές οι αναφορές αντιπροσωπεύουν τη γέννηση της συνθετικής βιολογίας. Από το 2004 έως το 2007, οι αρχές της μηχανικής εξέλιξαν τον τομέα περαιτέρω, εισάγοντας αρχές ηλεκτρικής και μηχανολογικής μηχανικής στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων. Επίσης ξεκίνησε η δημιουργία πολλών σχετικών βάσεων δεδομένων, όπως το Registry Of Standard Biological Parts [18] και το OpenWetWare [19]. Το 2004 διεξήχθη για πρώτη φορά ο διαγωνισμός International Genetically Engineered Machine (iGEM) που στην πορεία κατόρθωσε να κάνει προσιτή τη συνθετική βιολογία σε μαθητές δευτεροβάθμιας και τριτοβάθμιας εκπαίδευσης από όλο τον κόσμο. Από το 2008, έχουν αναπτυχθεί διάφορα γενετικά κυκλώματα με αυξημένη πολυπλοκότητα, δυναμική και ακρίβεια, συνοδευόμενα από αντίστοιχα υπολογιστικά μαθηματικά μοντέλα. Κομβικό σημείο αποτελεί η κατασκευή λογικών πυλών (logic gates) στο *Escherichia coli* [20]. Πιο πρόσφατα, το 2013 εφευρέθηκε μια επαναστατική μέθοδος επεξεργασίας γονιδιώματος ονόματι CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), σημαίνοντας την αρχή μίας νέας εποχής για τη συνθετική βιολογία [21].

Αν και υπάρχουν πολλοί ορισμοί για τη συνθετική βιολογία, μία επικρατώσα άποψη είναι ότι η συνθετική βιολογία είναι ένας διεπιστημονικός ερευνητικός κλάδος που συνδυάζει τη βιολογία, τη

χημεία, τα μαθηματικά, την επιστήμη των υπολογιστών και τη μηχανική, και ασχολείται με την τροποποίηση, το σχεδιασμό και τη *de novo* κατασκευή βιολογικών συστημάτων με επιθυμητές ιδιότητες [15]. Γονίδια ή ρυθμιστικές αλληλουχίες με επιλεγμένα χαρακτηριστικά συνδυάζονται σαν τουβλάκια LEGO και μεταφέρονται σε οργανισμούς ενδιαφέροντος ή σε cell-free συστήματα για να επιτύχουν τις επιθυμητές βιολογικές λειτουργίες [22]. Πλέον, τα βασικά γενετικά στοιχεία που απαιτούνται για την κατασκευή γενετικών κυκλωμάτων (υποκινητές, αλληλουχίες Shine-Dalgarno (SD), κωδικές αλληλουχίες, τερματιστές κ.λπ.) έχουν χαρακτηριστεί πλήρως και έχουν καταχωρηθεί ως τυποποιημένα τμήματα BioBrick σε βάσεις δεδομένων για να διευκολύνουν και να επιταχύνουν τη διαδικασία σχεδιασμού και δόμησης των καινοτόμων βιολογικών συστημάτων [18].



ΕΙΚΟΝΑ Α.2.1: (Α) Σχηματική απεικόνιση της αναλογίας BioBricks και κομματιών LEGO. (Β) Συμβολισμοί των κύριων BioBricks που χρησιμοποιούνται σε βιολογικά κυκλώματα. [23]

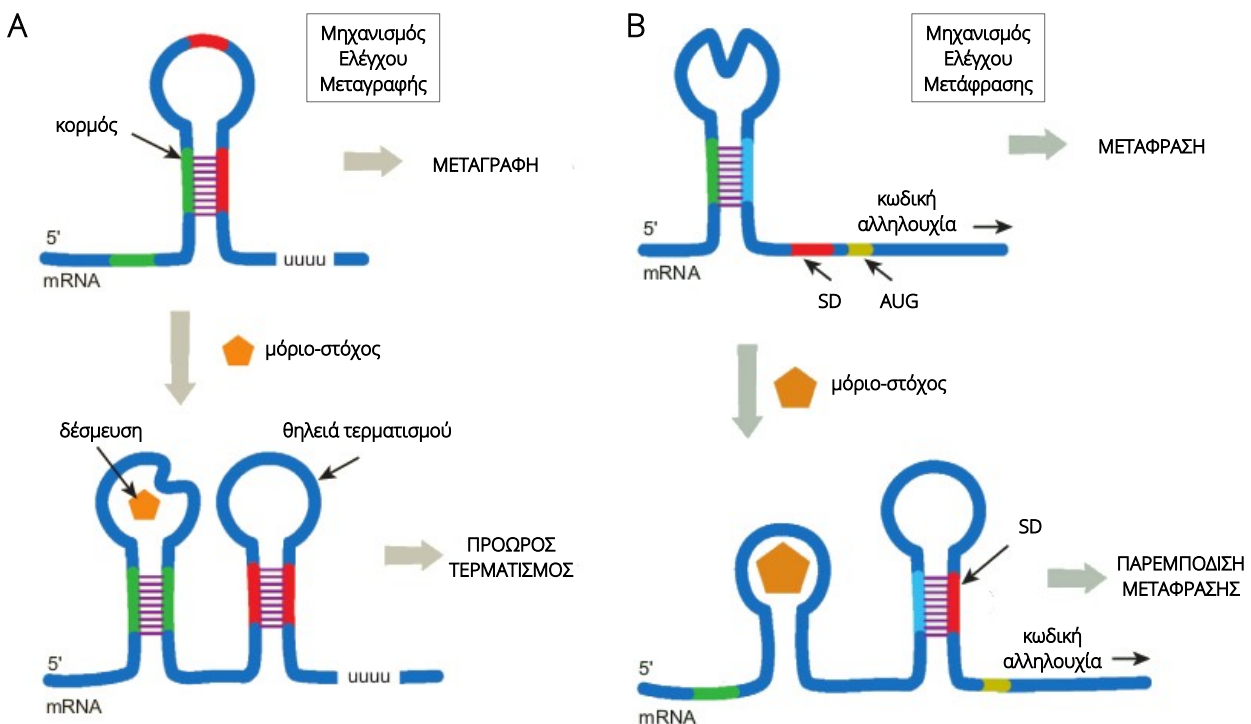
Με την ταχεία πρόοδο στους σχετικούς τομείς, αναμένεται ότι η συνθετική βιολογία μπορεί να ξεπεράσει τους περιορισμούς της φυσικής εξέλιξης και να δημιουργήσει συστήματα με σχεδόν πλήρως ελεγχόμενες ιδιότητες. Η ανάπτυξη και οι εφαρμογές της συνθετικής βιολογίας δε θα ωφελήσουν μόνο τις βασικές μελέτες σχετικά με τους θεμελιώδεις νόμους της ζωής αλλά θα παράσχουν επίσης νέα εργαλεία και προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση πολλών βασικών προβλημάτων της ανθρωπότητας, όπως η ενέργεια, ο υποσιτισμός και η ρύπανση.

Παρ' όλα αυτά, η συνθετική βιολογία συναντά το δίλημμα της πρόθεσης σε κάθε χρήση της. Αυτό έγκειται στο ότι η τεχνογνωσία είναι πιθανό να χρησιμοποιηθεί για κακόβουλους σκοπούς. Οι κίνδυνοι εν προκειμένω αφορούν κυρίως δύο σκοπιές, αυτές της βιοηθικής και της βιοασφάλειας. Αν και η πιθανότητα κατάχρησης της συνθετικής βιολογίας δε μπορεί να εξαλειφθεί πλήρως, οι κίνδυνοι μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με επαρκή ενημέρωση και με εφαρμογή σχετικών δεοντολογικών μέτρων και περιοριστικών νομοθεσιών. Ωστόσο, η υποκειμενικότητα της ηθικής καθιστά εξαιρετικά δύσκολη την αποτελεσματική εδραίωση της καλόβουλης εφαρμογής της συνθετικής βιολογίας.

A.2.2 Ριβοδιακόπτες και RNA-βιοαισθητήρες

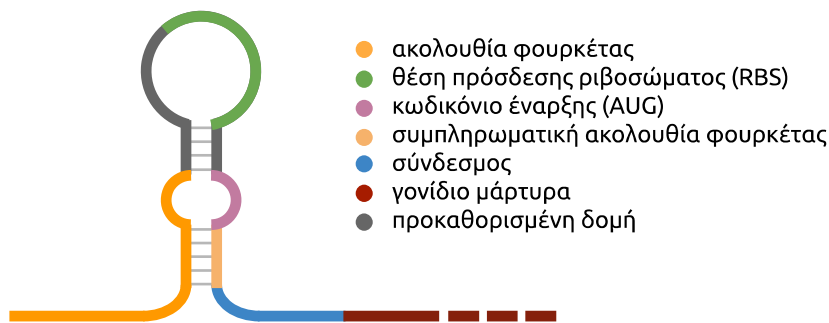
Τα μόρια RNA έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν σύνθετες δομές στο χώρο ανάλογα με την αλληλουχία τους ενώ ακόμη μπορούν να επιτελούν διάφορες λειτουργίες με βάση τη διαμόρφωσή τους. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να δρουν ως ρυθμιστικά εργαλεία σε επίπεδο μεταγραφής ή μετάφρασης [24]. Οι εν λόγω μηχανισμοί απαντώνται φυσικά στους προκαρυώτες και στους ευκαρυώτες [25]. Αυτά τα χαρακτηριστικά του RNA το καθιστούν κατάλληλο για λογικό σχεδιασμό κυκλωμάτων και έτσι μπορεί να λειτουργήσει ως βιοαισθητήρας, προσφέροντας μεγάλη δυναμική ανίχνευσης, ειδικότητα και ευελιξία σχεδιασμού.

Οι RNA βιοαισθητήρες είναι γενετικά κυκλώματα που δομούνται από μόρια RNA και ελέγχονται από ριβοδιακόπτες (riboregulators / riboswitches) [26]. Εν γένει οι ριβοδιακόπτες αποτελούνται από μία δομή απταμερούς (aptamer domain) στο 5' άκρο τους και καταρροϊκά αυτής ακολουθεί μία πλατφόρμα έκφρασης (expression platform) που αντιστοιχεί σε μία κωδική αλληλουχία [27]. Τα απταμερή, που λειτουργούν ως ο υποδοχέας των ριβοδιακοπών, είναι ολιγονουκλεοτίδια ικανά να δεσμεύουν σχεδόν οποιοδήποτε μόριο-στόχο με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα [28]. Η δέσμευση του μορίου-στόχου στο απταμερές ενός ριβοδιακόπτη σταθεροποιεί συγκεκριμένα δομικά στοιχεία της πλατφόρμας έκφρασης, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση του / των γονιδίων που ακολουθούν. Με αυτό τον τρόπο, οι ριβοδιακόπτες ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής ή / και της μετάφρασης.



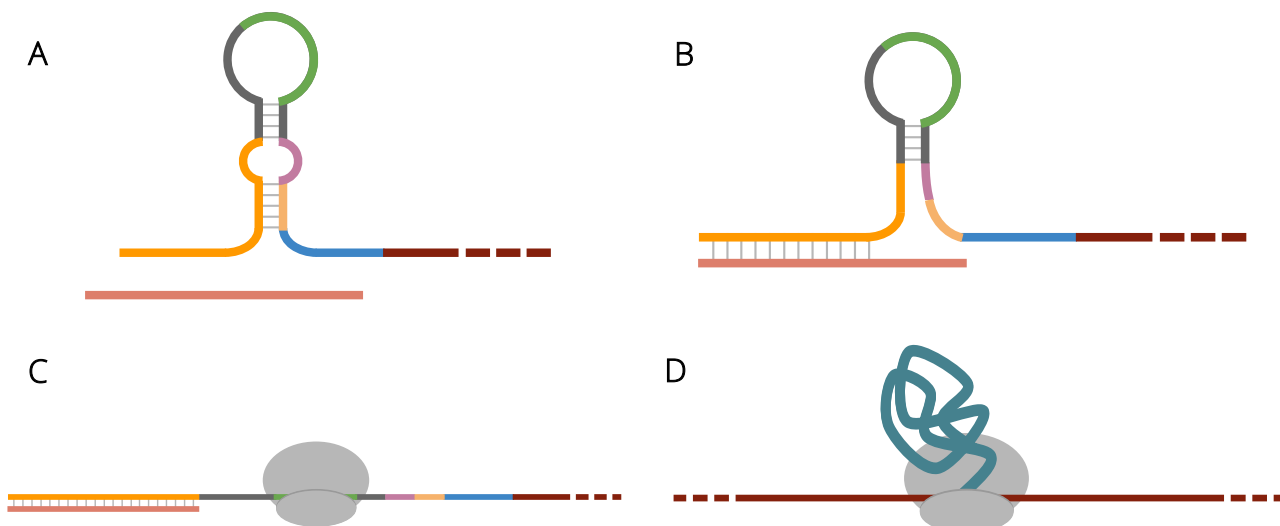
ΕΙΚΟΝΑ A.2.2: Οι ριβοδιακόπτες παρουσιάζουν δύο εναλλακτικές δομές – κορμού και θηλειάς – ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία του μορίου-στόχου. (A) Η παρουσία του μορίου-στόχου προκαλεί το σχηματισμό της δομής τερματισμού (θηλειά) και η μεταγραφή διακόπτεται. (B) Η παρουσία του μορίου-στόχου προκαλεί δέσμευση της αλληλουχίας Shine-Dalgarno (SD) σε θηλειά, εμποδίζοντας τη μετάφραση. [29]

A.2.3 Toehold Switches



ΕΙΚΟΝΑ Α.2.3: Δομικά στοιχεία ενός toehold switch.

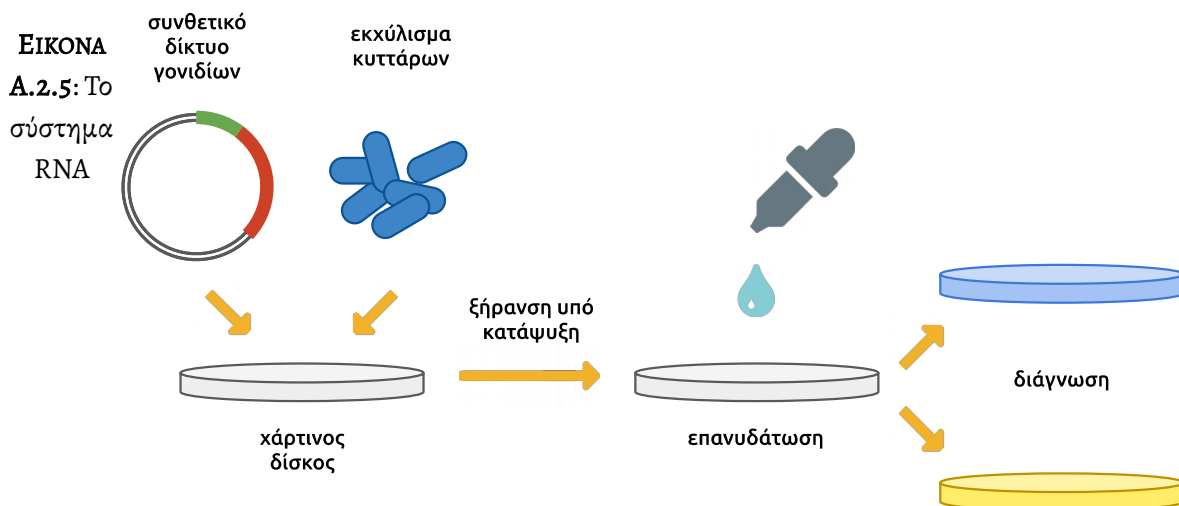
Ένας εναλλακτικός σχεδιασμός για το μηχανισμό των RNA βιοαισθητήρων πραγματοποιήθηκε από τους Green *et al.* [30] με τη μορφή των ριβοδιακοπών τύπου φουρκέτας (toehold switches). Στον προτεινόμενο μηχανισμό τους, εισάγεται στο 5' άκρο του ριβοδιακόπτη η ακολουθία τύπου φουρκέτας (toehold domain), που αποτελεί τη δομή απταμερούς του ριβοδιακόπτη, για τη δέσμευση του RNA-στόχου (trigger RNA). Εντός της δομής φουρκέτας, είναι εγκλωβισμένη η θέση πρόσδεσης ριβοσώματος (ribosome binding site – RBS), παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του ριβοσώματος στο mRNA. Η μετάφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης-μάρτυρα (reporter protein) πραγματοποιείται μόνο όταν το trigger RNA δεσμεύεται στο toehold domain, ξετυλίγοντας τη δομή φουρκέτας και απελευθερώνοντας το RBS. Μάλιστα, αυτός ο καινοτόμος ριβοδιακόπτης μπορεί να κατασκευαστεί για την ανίχνευση όχι μόνο σύντομων trigger RNAs, αλλά και για RNA πλήρους μήκους, προσφέροντας έτσι ευρύτερο φάσμα εφαρμογής στις χρήσεις των RNA βιοαισθητήρων [31].



ΕΙΚΟΝΑ Α.2.4: Ο μηχανισμός toehold switch. (A) Ο ριβοδιακόπτης βρίσκεται σε κατάσταση ON και το toehold domain έχει τη δομή φουρκέτας. (B) Το trigger RNA προσδένεται στο toehold domain και η δομή φουρκέτας ξετυλίγεται σταδιακά. (C) Ο ριβοδιακόπτης βρίσκεται σε κατάσταση OFF και το ριβόσωμα πλέον μπορεί να προσδεθεί στο RBS. (D) Η πρωτεΐνη-μάρτυρας μεταφράζεται.

A.2.4 RNA-Βιοισθητήρες Επί Χάρτου

Ένας προχωρημένος σχεδιασμός του εν λόγω *in vitro* διαγνωστικού μηχανισμού, πραγματοποιήθηκε από τους Pardee *et al.* [31] Στο σύστημα που σχεδίασαν, κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου που κωδικοποιεί τα συνθετικά κυκλώματα γονιδίων των toehold switches, σύστημα μεταγραφής (RNA πολυμεράση, πηγή ενέργειας – τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), μεταγραφικοί παράγοντες, νουκλεοτίδια) και σύστημα μετάφρασης (ριβοσώματα, πηγές ενέργειας (ATP και τριφωσφορική γουανιδίνη (GTP), tRNAs, αμινοξέα) ξηραίνονται υπό κατάψυξη σε δίσκους χάρτου ή άλλα πορώδη υλικά. Η ξήρανση αδρανοποιεί πλήρως κάθε αντίδραση πάνω στο χαρτί. Με την επανυδάτωση, ξεκινά η λειτουργία του RNA βιοισθητήρα. Χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο ως εκμαγείο για την παραγωγή των toehold switches μέσω μεταγραφής, και παρουσία trigger RNA, η πρωτεΐνη-μάρτυρας μεταφράζεται. Αυτός ο μηχανισμός παρουσιάζει εξαιρετική ορθογωνικότητα και ρεαλιστικότερο σχεδιασμό λειτουργίας, καθώς τα toehold switches δεν αποθηκεύονται στην RNA μορφή τους αλλά ως τα μητρικά τους DNA, ξεπερνώντας το σκόπελο της αστάθειας των μορίων RNA και προσδίδοντας τη δυνατότητα μακροχρόνιας αποθήκευσης του συστήματος σε θερμοκρασία δωματίου.



βιοισθητήρα επί χάρτου όπως σχεδιάστηκε από τους Pardee *et al.* Το συνθετικό δίκτυο γονιδίων κωδικοποιεί τα toehold switches και το εκκύλισμα κυττάρων περιέχει όλες πρώτες ύλες και εργαλεία είναι απαραίτητα για τους μηχανισμούς μεταγραφής και μετάφρασης. Αυτά ξηραίνονται σε χάρτινους δίσκους και αδρανοποιούνται. Με επανυδάτωση, το σύστημα ενεργοποιείται και γίνεται προσθήκη του επεξεργασμένου δείγματος. Το σήμα λαμβάνεται μέσω αλλαγής χρώματος του δίσκου.

Αυτό το σύστημα απεδείχθη να είναι μία πολλά υποσχόμενη διαγνωστική εφαρμογή, αρχικά ανιχνεύοντας mRNA διαφόρων γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά. Επιπλέον εν συνεχεία, το σύστημα διέκρινε επιτυχώς δύο στελέχη του ιού Ebola, αυτά του Ζαΐρ και του Σουδάν, τα οποία διαφέρουν σε μήκος μόλις τριών νουκλεοτιδίων. Επίσης, η διάγνωση ήταν εφικτή εντός του χρονικού

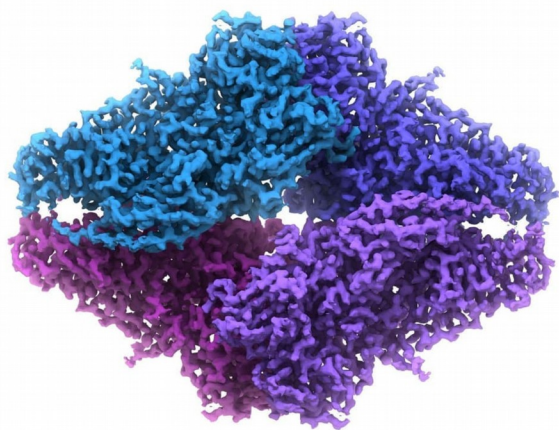
πλασίου των 3 ωρών, με το όριο ανίχνευσης mRNA να βρίσκεται στα 30 nanomolar (nM), πιστοποιώντας την υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία του συστήματος από την πρώτη κιόλας εφαρμογή του [32].

Αυτή η εφαρμογή της πλατφόρμας των toehold switches έδειξε πολλά πλεονεκτήματα ως διαγνωστικό εργαλείο, καθώς μπορεί να παραχθεί εύκολα και οικονομικά, να αποθηκευτεί μακροχρόνια, καθώς και να χρησιμοποιηθεί μαζί, ειδικά σε περιοχές όπου δεν είναι διαθέσιμες εργαστηριακές υποδομές. Εξετάζοντας αποκλειστικά το κόστος των αντιδραστηρίων, το σύστημα αυτό υπολογίζεται να έχει κόστος κατασκευής μόλις 0,02 έως 0,04 USD ανά αισθητήρα χρησιμοποιώντας εργαστηριακά παραγμένα cell-free συστήματα έκφρασης (ή 0,35 έως 0,65 USD χρησιμοποιώντας εμπορικά cell-free συστήματα έκφρασης), σε σύγκριση με 1.50 έως 4.00 USD που απαιτούνται για δοκιμή με βάση την PCR. Συνολικά, οι βιοαισθητήρες χάρτου τύπου toehold switch μπορούν να κατασκευαστούν σε λιγότερο από 12 ώρες με συνολικό κόστος 21 USD ανά αισθητήρα, συγκριτικά με τον χρόνο ανάπτυξης 2-6 μηνών και το κόστος 4000-30.000 USD για αντίστοιχες διαθέσιμες εμπορικές εφαρμογές που βασίζονται στο μηχανισμό των αντισωμάτων. Το σύστημα αυτό παρουσιάζει όχι μόνο σημαντικά χαμηλότερο κόστος ανάπτυξης, αλλά και γρηγορότερο σχεδιασμό και λιγότερα στάδια παραγωγής σε σύγκριση με διαγνωστικά πακέτα με βάση τα αντισώματα ή την PCR. Επιπλέον, τα toehold switches απαιτούν για το σχεδιασμό τους αποκλειστικά τη γενετική πληροφορία του RNA-στόχου ανίχνευσης, γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για την γρήγορη και εύκολη ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων για αναδυόμενους επικίνδυνους ιούς ή βακτήρια [26, 33].

A.2.5 Πρωτεΐνη-Μάρτυρας

Προς το παρόν, οι κύριες πρωτεΐνες που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρες σε συστήματα με toehold switches είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein – GFP) και παραλλαγές της, καθώς επίσης και η λουσιφεράση και η β-γαλακτοζιδάση. Στην περίπτωση της GFP, το σήμα δίνει άμεσα η ίδια η πρωτεΐνη-μάρτυρας, εφόσον φθορίζει πράσινο απορροφώντας στο υπεριώδες φως [34]. Η GFP έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για λόγους εύκολης ποσοτικοποίησης του σήματος. Η λουσιφεράση και η β-γαλακτοζιδάση δίνουν έμμεσα σήμα, μέσω της καταλυτικής τους δραστηριότητας. Η λουσιφεράση καταλύει το υπόστρωμά της, λουσιφερίνη, καταναλώνοντας ATP και οξυγόνο, και παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα φωτός [35]. Η β-γαλακτοζιδάση με την καταλυτική της δράση, μετατρέπει τη λευκή / υποκίτρινη ουσία του υποστρώματός της, X-gal, σε μπλε [36]. Αρκετά εύκολα συμπεραίνει κανείς πως η πιο ταιριαστή πρωτεΐνη-μάρτυρας εξ αυτών για την εφαρμογή βιοαισθητήρα toehold switches επί χάρτου είναι η β-γαλακτοζιδάση, καθώς παράγει χρωματική αλλαγή στους χάρτινους δίσκους, που αποτελεί ένα ευανάγνωστο σήμα, ορατό διά γυμνού οφθαλμού, χωρίς την απαίτηση επιπρόσθετου εξοπλισμού. Για αυτό το λόγο και προτιμήθηκε από την ομάδα του Pardee στο σχεδιασμό τους (Εικόνα 2.4), αλλά και από τις περισσότερες ομάδες που εν συνεχεία ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη του συστήματος επί χάρτου.

Ωστόσο, η ευκολία λήψης σήματος δεν είναι το μόνο κριτήριο για την επιλογή της πρωτεΐνης-μάρτυρα στα συστήματα με toehold switches. Μία μεγαλύτερη πρωτεΐνη-μάρτυρας συνεπάγεται και ένα μακρύτερο mRNA που την κωδικοποιεί, με πιο πολύπλοκη δομή στο χώρο. Έτσι, τείνει να καθυστερήσει το τελικό σήμα, αυξάνοντας το φορτίο μεταγραφής και μετάφρασης, καθώς και παρεμποδίζοντας στερεοχημικά την προσέγγιση του trigger RNA στο toehold domain [36]. Η GFP, η λουσιφεράση και η β-γαλακτοζιδάση έχουν μήκος 238, 550 και 1024 αμινοξέα αντίστοιχα [37, 38, 39]. Βλέποντας πως η πιο δόκιμη πρωτεΐνη-μάρτυρας σε αυτό το σύστημα, η β-γαλακτοζιδάση, έχει σημαντικά μεγάλο μήκος, για πρώτη φορά η ομάδα iGEM EPFL 2017 [40] δοκίμασε μία εναλλακτική προσέγγιση, αξιοποιώντας το μηχανισμό της α-συμπληρωματικότητας (α-complementation) [41].



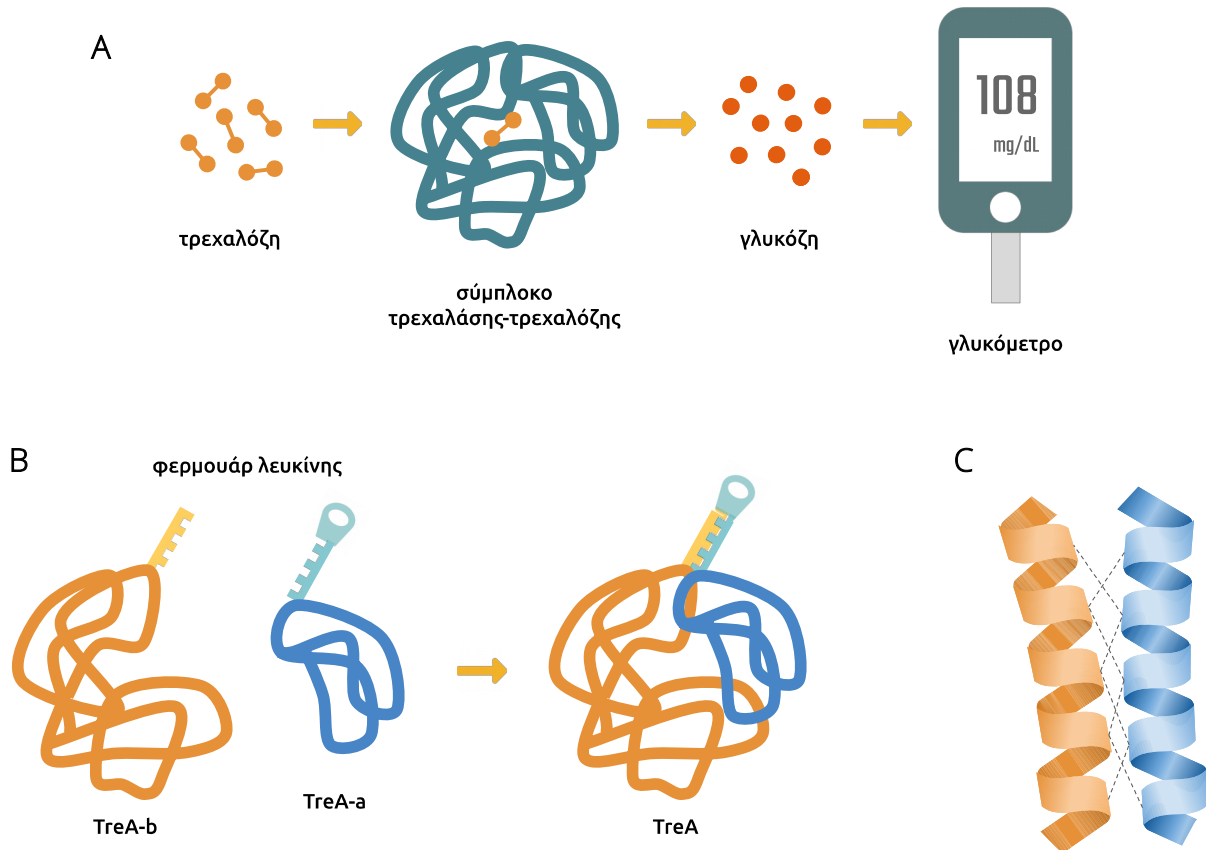
ΕΙΚΟΝΑ Α.2.6: Η β-γαλακτοζιδάση (lacZ) είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από 4 πανομοιότυπες υπομονάδες. Η α υπομονάδα της αναλαμβάνει το ρόλο της αυθόρμητης ένωσης των 4 υπομονάδων ώστε να δομήσουν ένα ενιαίο μόριο. [40]

Ενσωματώνοντας την α υπομονάδα (LacZ-α) στη δομή των toehold switches ως πρωτεΐνη-μάρτυρα και προσθέτοντας την υπόλοιπη πρωτεΐνη (LacZ-ω) ήδη παραγμένη στο σύστημα, όταν το toehold switch ενεργοποιείται και η πρωτεΐνη-μάρτυρας παράγεται, μέσω της α-συμπληρωματικότητας, δομείται η β-γαλακτοζιδάση. Η ομάδα του Alexander Green [42] ένα χρόνο αργότερα, απέδειξε πως αυτός ο μηχανισμός μπορεί να μειώσει το χρόνο διάγνωσης σε βιοαισθητήρες επί χάρτου έως και 23 λεπτά (41%) σε σύγκριση με τα το σύστημα που χρησιμοποιεί το πλήρες μήκος του lacZ ως μάρτυρα.

A.2.6 Η Τρεχαλάση Ως Πρωτεΐνη-Μάρτυρας

Η τρεχαλάση (TreA) είναι ένα γλυκολυτικό ένζυμο που υπάρχει στον περιπλασμικό χώρο του *E. coli* και καταλύει την υδρόλυση της τρεχαλόζης σε δύο μόρια γλυκόζης. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης αυτής μπορεί να μετρηθεί με ένα εμπορικό γλυκόμετρο. Σε σχετική μελέτη τους, οι Drikkic *et al.* [43], χαρακτήρισαν για πρώτη φορά την τρεχαλάση ως πρωτεΐνη-μάρτυρα και απέδειξαν ότι αυτή η πλατφόρμα μπορεί να ανιχνεύσει μια ευρεία ποικιλία στόχων, όπως αντισώματα, βακτήρια και πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός που πρότειναν είναι αντίστοιχος της α-συμπληρωματικότητας. Η τρεχαλάση χωρίστηκε σε δύο τμήματα (TreA-a και TreA-b) τα οποία δεν παρουσιάζουν αυτόνομα καταλυτική ικανότητα. Επειδή ωστόσο, τα δύο αυτά τμήματα δεν έχουν τη

δυνατότητα αυθόρμητης επανένωσης -όπως συμβαίνει για τη β-γαλακτοζιδάση- εν προκειμένω ενώθηκαν με ένα ζεύγος *in silico* σχεδιασμένων φερμουάρ λευκίνης [44]. Τα φερμουάρ λευκίνης αποτελούν ένα πρωτεϊνικό μοτίβο και δομούνται από δύο α-έλικες, με μία ορισμένη συμπληρωματική αλληλουχία υδρόφοβων / υδρόφιλων αμινοξέων, η οποία τις αναγκάζει αυθόρμητα να αλληλεπιδρούν και να ενώνονται μεταξύ τους. Ενώνοντας την TreA-a με τη μία α-έλικα του φερμουάρ λευκίνης και την TreA-b με τη συμπληρωματική της, τα δύο τμήματα ενώνονται δομώντας ένα λειτουργικό μόριο TreA.



ΕΙΚΟΝΑ Α.2.7: (Α) Η τρεχαλάση ως πρωτεΐνη-μάρτυρας. (Β) Ο μηχανισμός επανένωσης των δύο τμημάτων της τρεχαλάσης μέσω φερμουάρ λευκίνης. (C) Φερμουάρ λευκίνης.

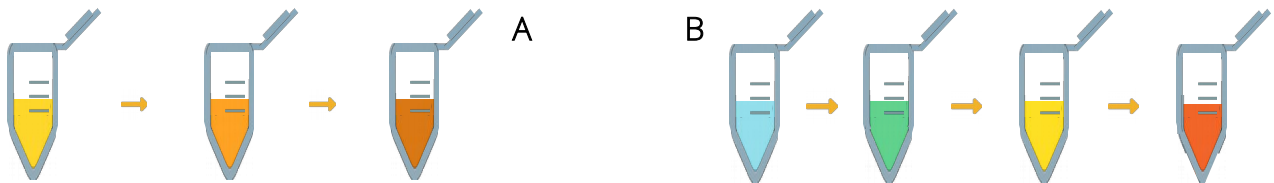
A.2.7 Ανίχνευση Γλυκόζης

Το συμβατικό γλυκόμετρο αποτελεί ένα παρακλίνιο όργανο προσδιορισμού της γλυκόζης. Εκτός αυτού, έχουν αναπτυχθεί ακριβείς και απλές μέθοδοι προσδιορισμού της σε εργαστηριακό επίπεδο. Η γλυκόζη αποτελεί ένα αναγωγικό σάκχαρο, δηλαδή ένα σάκχαρο με ελεύθερο το ημιακεταλικό του υδροξύλιο. Οι μέθοδοι προσδιορισμού της λοιπόν, βασίζονται σε αυτή την ιδιότητά της.

Μία ευρέως εργαστηριακά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης της γλυκόζης είναι η φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) [45]. Βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση

σε θερμοκρασία πάνω από τους 70 °C. Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm.

Μία ποιοτική μέθοδος για την ανίχνευση της γλυκόζης και γενικότερα των αναγωγικών σακχάρων είναι το τεστ μέσω του αντιδραστήριου Benedict's [46]. Το αντιδραστήριο περιέχει θειικό χαλκό, ο οποίος οξειδώνεται παρουσία δίνοντας ίζημα οξειδίου χαλκού και αλλάζοντας το χρώμα του διαλύματος. Τα θετικά αποτελέσματα κυμαίνονται σε ένα φάσμα από πράσινο-κίτρινο έως κόκκινο-καφέ, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναγωγικού παράγοντα, με παρουσία ιζήματος.



ΕΙΚΟΝΑ Α.2.8: Το χρωματικό φάσμα της αντίδρασης DNS (A) και του αντιδραστήριου Benedict's (B).

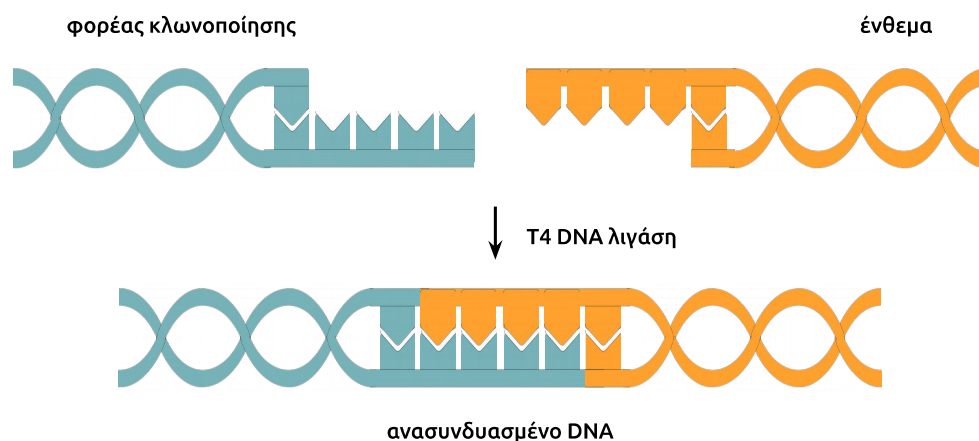
Κεφάλαιο Α.3

Κατασκευή Πλασμιδίων

Η κλωνοποίηση αποτελεί ένα σύνολο πειραματικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ενός πληθυσμού οργανισμών που φέρουν το ίδιο μόριο ανασυνδυασμένου DNA. Το μόριο αυτό αρχικά συναρμολογείται *in vitro* και στη συνέχεια μεταφέρεται σε οργανισμό ξενιστή, που μπορεί να κατευθύνει την αντιγραφή του σε συντονισμό με την ανάπτυξή του, παράγοντας ουσιαστικά απεριόριστα πανομοιότυπα αντίγραφα αυτού του DNA. Η κατασκευή πλασμιδίων και η κλωνοποίηση υπήρξαν η βάση της μοριακής βιολογίας για αρκετές δεκαετίες, και έτσι γίνεται σαφής η κρισιμότητα επιλογής της κατάλληλης μεθόδου για αυτές τις διαδικασίες [47].

A.3.1 Συμβατική Ένωση Τμημάτων DNA (DNA Ligation)

Τα ένζυμα περιορισμού δημιουργούν τομές στο DNA με συγκεκριμένο μοτίβο. Τα θραύσματα που προκύπτουν έχουν μονόκλωνες "ουρές" στα άκρα τους, οι οποίες είναι συμπληρωματικές με τις αυτές σε κάθε άλλο θραύσμα DNA που έχει παραχθεί από το ίδιο ένζυμο περιορισμού. Σε θερμοκρασία δωματίου, αυτές οι μονόκλωνες περιοχές, συχνά αποκαλούμενες "κολλώδη άκρα (sticky ends)", μπορούν προσωρινά να υβριδιστούν συμπληρωματικά, ανεξάρτητα από την πηγή του DNA. Αυτή η ιδιότητα των κολλωδών άκρων επιτρέπει την ένωση διαφορετικών τμημάτων DNA, σχηματίζοντας ανασυνδυασμένα μόρια.



ΕΙΚΟΝΑ Α.3.1: Η διαδικασία ένωσης φορέα κλωνοποίησης και ενθέματος μέσω κολλωδών άκρων, από την T4 DNA λιγάση.

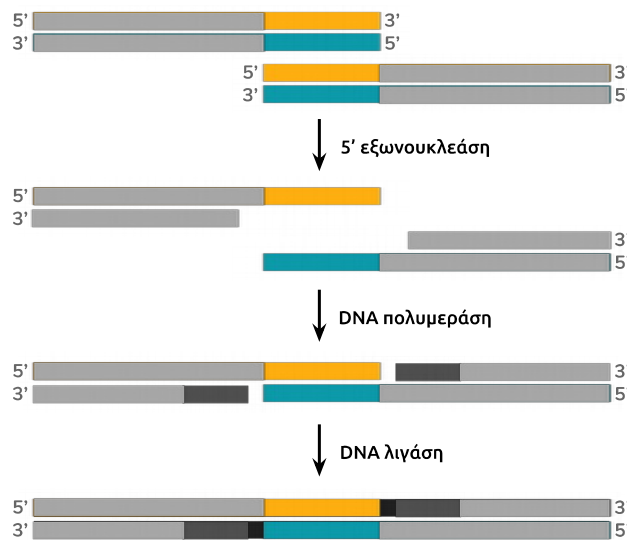
Κατά τη διάρκεια του *in vivo* αναδιπλασιασμού του DNA, η DNA λιγάση καταλύει τον σχηματισμό 3' - 5' φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των βραχέων θραυσμάτων του ασυνεχώς συντιθέμενου (καθυστερούμενου) κλώνου DNA. Στην τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, λειτουργώντας με τον ίδιο τρόπο, T4 DNA λιγάση χρησιμοποιείται για την *in vitro* σύνδεση των άκρων τμημάτων DNA που έχουν προκύψει από πέψη ενζύμων περιορισμού [48].

A.3.2 Καινοτόμοι Μέθοδοι Κατασκευής Πλασμιδίων

Παρόλο που η κλωνοποίηση με χρήση ενζύμων περιορισμού όπως περιγράφηκε παραπάνω είναι κατάλληλη για κλωνοποίηση δύο τμημάτων DNA (ένωση ενός ενθέματος με φορέα κλωνοποίησης), αυτή η μέθοδος καθίσταται μη αποτελεσματική για μεγαλύτερο αριθμό τμημάτων DNA. Η αναποτελεσματικότητα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις σύντομες μονόκλωνες προεξοχές 2-4 bp που δημιουργούνται από την πέψη με ένζυμα περιορισμού, τα λεγόμενα κολλώδη άκρα. Τέτοιες αλληλουχίες δεν παρέχουν επαρκή σταθερότητα ή ειδικότητα για αποτελεσματική κατασκευή πλασμιδίων που περιλαμβάνει τρία ή περισσότερα τμήματα DNA, σε ένα στάδιο. Επιπλέον, καθώς ο αριθμός των τμημάτων αυξάνει, καθίσταται δύσκολο να βρεθούν μοναδικές θέσεις περιορισμού στο φορέα για τη ένθεσή τους. Η κατασκευή πλασμιδίων από πολλαπλά τμήματα DNA μέσω συμβατικής κλωνοποίησης περιλαμβάνει πολυάριθμα στάδια υπο-κλωνοποίησης που σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να απαιτήσουν από εβδομάδες έως και μήνες εργαστηριακής δουλειάς. Ωστόσο, ίσως ο σημαντικότερος προβληματισμός επάνω στη μέθοδο είναι πως, με βάση τη φύση της, στα σημεία ένωσης φορέα και ενθέματος, υποχρεωτικά μένουν οι αλληλουχίες των ενζύμων περιορισμού, ως “ουλές”. Στο πλαίσιο του ορθολογικού σχεδιασμού των BioBricks, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο A.2, συχνά απαιτείται τα τμήματα DNA προς ένωση να έχουν λογική συνέχεια μεταξύ τους, χωρίς διακοπές. Για αυτό το λόγο, ιδίως την τελευταία δεκαετία, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές κλωνοποίησης “χωρίς ουλές” (seamless cloning), πολλές εκ των οποίων έχουν εδραιωθεί στην έρευνα της συνθετικής βιολογίας και όχι μόνο [49]. Δύο εξ αυτών αναλύονται παρακάτω.

A.3.3 Η μέθοδος του Gibson Assembly

Μία από τις σχετικά πιο πρόσφατες, αλλά και απλούστερες μεθόδους ένωσης τμημάτων DNA είναι αυτή του Gibson Assembly [50]. Για να επιτευχθεί η αντίδραση, η τεχνική απαιτεί πως οι αλληλουχίες DNA προς ένωση μεταξύ τους παρουσιάζουν 20-150 bp επικαλύψεις στα άκρα τους. Με αυτή τη βάση, τρία διαφορετικά ένζυμα DNA δρουν ταυτόχρονα, για να πραγματοποιήσουν τη συναρμογή πολλαπλών τμημάτων dsDNA: 1) μία 5' εξωνουκλεάση, η οποία υδρολύει νουκλεοτίδια από το 5' άκρο κάθε τμήματος DNA προς ένωση και εκθέτει μία μονόκλωνη 3' “ουρά” που μπορεί να υβριδιστεί με άλλη εκτεθειμένη συμπληρωματική “ουρά” ssDNA 2) μία DNA πολυμεράση που συμπληρώνει τα νουκλεοτίδια που λείπουν μετά τον υβριδισμό δύο “ουρών” και 3) μια DNA λιγάση που ενώνει ομοιοπολικά το τελικό με το αρχικό νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε δύο τμήματα DNA.

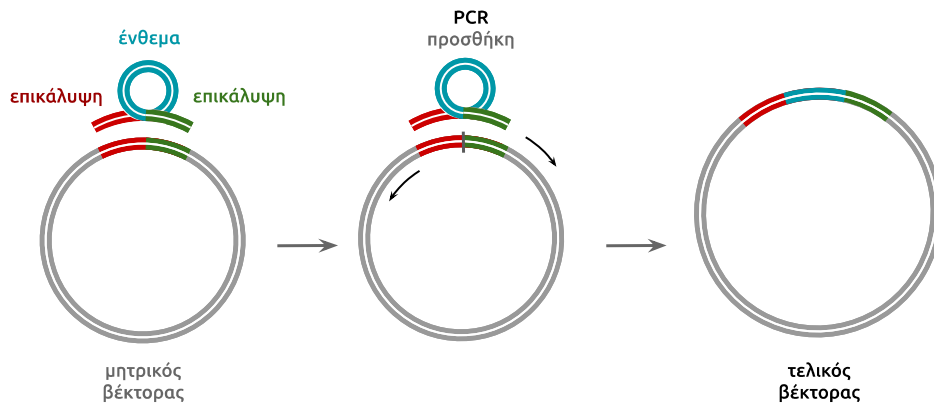


ΕΙΚΟΝΑ Α.3.2: Η μέθοδος Gibson Assembly.

Το Gibson Assembly παρουσιάζει πολυάριθμα πλεονεκτήματα. Χαρακτηριστικά, έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς ένωση έως και 52 ολιγονουκλεοτιδίων μέσω της τεχνικής αυτής, σε ένα μόνο στάδιο [51]. Καθώς όλα τα ένζυμα και τα τμήματα DNA που απαιτούνται για τη συναρμογή αναμειγνύονται ταυτόχρονα, το Gibson Assembly απαιτεί ένα μόνο βήμα και μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε περίπου μία ώρα αντίδρασης. Ακόμη, δεν εξαρτάται από συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (π.χ. θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού) και έτσι δεν προκύπτουν "ουλές", δηλαδή περιττές αλληλουχίες που να διακόπτουν το "νόημα", στην τελική αλληλουχία. Το τελικό προϊόν επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα σε διαφορετικά μεταγενέστερα στάδια, π.χ. μετασχηματισμό βακτηρίων (εάν η ένωση γίνεται με βάση ένα φορέα κλωνοποίησης), ενζυματική πέψη για κλωνοποίηση ή PCR [52].

A.3.3 Restriction Free Cloning - RFC

Αυτή η μέθοδος κλωνοποίησης έχει βασιστεί στη συμβατική κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. Σύμφωνα με τη συμβατική μέθοδο, δύο επικαλυπτόμενοι εκκινητές (25-45 νουκλεοτίδια ο καθένας) χρησιμοποιούνται σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εισαγωγή συγκεκριμένων μεταλλάξεων μέσα σε ένα πλασμίδιο. Στην τεχνική RFC, η αλληλουχία ενδιαφέροντος (ένθεμα) ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας δύο εκκινητές, με τον καθένα να περιέχει μία επέκταση στο 5' άκρο του, δημιουργώντας ομόλογες επικάλυψεις με τον φορέα κλωνοποίησης, εκατέρωθεν της επιθυμητής θέσης εισαγωγής. Το δίκλωνο προϊόν της PCR χρησιμοποιείται ως ένα "υβριδισμένο ζεύγος εκκινητών" για μία δεύτερη αντίδραση ενίσχυσης. Σε αυτό το βήμα, κάθε κλώνος του προϊόντος υβριδίζεται με τον φορέα κλωνοποίησης στις θέσεις επικάλυψής τους και εκκινείται ο πολυμερισμός. Οι δύο νέοι DNA κλώνοι σχηματίζουν ένα δίκλωνο πλασμίδιο με τις επιθυμητές μεταλλάξεις [53].



ΕΙΚΟΝΑ Α.3.3: Η μέθοδος RFC για προσθήκη ενθέματος.

Η μέθοδος RFC παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, γεγονός που την καθιστά εξαιρετικά ελκυστική λύση έναντι άλλων εναλλακτικών μεθόδων κλωνοποίησης. Το RFC μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας οποιοδήποτε φορέα κλωνοποίησης και η αλληλουχία ενδιαφέροντος μπορεί να εισαχθεί σε οποιαδήποτε επιθυμητή θέση εντός του φορέα. Η μέθοδος επιτρέπει την εισαγωγή του ενθέματος χωρίς επιπλέον περιττές αλληλουχίες. Η αντίδραση είναι γρήγορη, εξαιρετικά αποτελεσματική και κατάλληλη για κλωνοποίηση υψηλής απόδοσης. Επίσης, το RFC δεν απαιτεί προεπεξεργασία του φορέα κλωνοποίησης με ένζυμα περιορισμού ή μέσω PCR, ενώ τέλος, αποφεύγει τη χρήση ακριβών εμπορικών κιτ [54].

Στόχος της Εργασίας

Ο ιός MERS-CoV είναι ένας κορονοϊός που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα παρουσιάζοντας ένα εύρος συμπτωμάτων που δυσχεραίνουν τη διάγνυσή του. Χαρακτηριστικά, το ποσοστό θνησιμότητας των ανθρώπων που προσβάλλονται από τον ιό ξεπερνά το 35%. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτηρίζει τον MERS-CoV ως έναν από τους πιο επικίνδυνους ιούς για την πρόκληση επιδημίας και κρίνει επείγουσα την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Με αυτή τη βάση, η προκειμένη εργασία στοχεύει στην ανάπτυξη μίας διαγνωστικής μεθόδου για την ανίχνευση του ιού. Η μέθοδος αυτή θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πυρήνας για τη δημιουργία ενός εύχρηστου, οικονομικού και γρήγορου διαγνωστικού κιτ, αξιόπιστου και ασφαλούς, που θα δύναται να χρησιμοποιηθεί μαζικά για παρακλίνιο έλεγχο, εκτός του εργαστηρίου και χωρίς την ανάγκη παρουσίας εξειδικευμένου προσωπικού, σε αντίθεση με τις υπάρχουσες μεθόδους μοριακής διάγνωσης.

Πιο συγκεκριμένα, η διαγνωστική μέθοδος προς ανάπτυξη βασίζεται στο μηχανισμό των toehold switches. Ένας από τους βασικότερους στόχους της εργασίας είναι η μελέτη ενός νέου μάρτυρα για το μηχανισμό, της τρεχαλάσης. Προτείνεται έτσι ο συνδυασμός της καινοτόμου τεχνολογίας των toehold switches με αυτή του συμβατικού μετρητή σακχάρου, για τη λήψη του τελικού σήματος διάγνωσης, που αποτελεί ένα έμπιστο όργανο που χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες.

Τέλος, στο πλαίσιο της εργαστηριακής ανάπτυξης του συστήματος, πραγματοποιείται μία απόπειρα εξοικείωσης με τεχνολογίες του κλάδου της συνθετικής βιολογίας, με βασικότερη έμφαση στις μεθόδους κλωνοποίησης. Για αυτό το σκοπό, γίνεται χρήση των τεχνικών του Gibson Assembly και του Restriction Free Cloning, δύο μεθόδων που επιτρέπουν γρήγορη κλωνοποίηση χωρίς “ουλές” (seamless cloning).

Μέρος Β. Υλικά & Μέθοδοι

B.1 Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (competent cells) *E. coli*

- Λήψη μικρής ποσότητας βακτηρίων *E.coli* μέσω εμβάπτισης στείρου tip σε στοκ γλυκερόλης καλλιέργειας αποθηκευμένο στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Εμβολιασμός τρυβλίου LB άγαρ με διαδοχικές αραιώσεις.
- Επώαση του τρυβλίου στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 16 ώρες.
- Λήψη μιας μονήρους αποικίας από το τρυβλίο και εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας των 5 mL LB σε αποστειρωμένο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Επώαση υπό ανακίνηση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 16 ώρες.
- Εμβολιασμός καλλιέργειας 100 mL LB με την υγρή καλλιέργεια των 5 mL.
- Επώαση υπό ανακίνηση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Λήψη δείγματος 1 mL καλλιέργειας προς μέτρηση απορρόφησης στα 600 nm ανά $\sim 30\text{ min}$, ωστόσο η απορρόφηση φτάσει την τιμή $\sim 0,5$, όπου και η επώαση σταματά.
- Τοποθέτηση της καλλιέργειας στον πάγο για $\sim 5\text{ min}$.
- Φυγοκέντρηση (3000 rpm / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου. Επανεναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 10 mL κρύου στείρου διαλύματος CaCl_2 0,1 M. Επώαση στον πάγο για 1,5 h.
- Προσθήκη 10 mL στείρου διαλύματος γλυκερόλης 40% v/v και ήπια ανάδευση.
- Διαμοιρασμός 200 μL /tube από το εναιώρημα σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Eppendorf.
- Αποθήκευση των δεκτικών βακτηρίων στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.2 Μετασηματισμός (transformation) δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

- Επώαση 200 μL δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (βλ. B1) στον πάγο για 15 min.
- Προσθήκη 2 μL πλασμιδιακού DNA στα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα και ήπια ανάδευση.
- Επώαση στον πάγο για 30 min.
- Θερμικό σοκ με επώαση για 90 s στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ και επακόλουθη τοποθέτηση στον πάγο για 2 min.
- Προσθήκη 800 μL προθερμασμένου στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ υγρού θρεπτικού υλικού LB.

- Επώαση της υγρής καλλιέργειας υπό ανακίνηση για 1 h στους 37 °C.
- Λήψη 100 μL από την καλλιέργεια και εμβολιασμός τρυβλίου. Άπλωμα του εμβολίου με τη βοήθεια στείρου βρόχου ενοφθαλμισμού.
- Φυγοκέντρηση της υπόλοιπης καλλιέργειας (8000 rpm / RT / 3 min).
- Απόρριψη των 800 μL από το υπερκείμενο, επανεναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος στο υπόλοιπο υπερκείμενο (~100 μL) και εμβολιασμός δεύτερου τρυβλίου.
- Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 16 h.

B.3 Απομόνωση ολικού (γενωμικού και πλασμιδιακού) DNA βακτηριακών κυττάρων *E. coli* BL21 μέσω χρήσης του Quick-DNA™ Miniprep Kit (Zymo Research)

- Λήψη μικρής ποσότητας βακτηρίων *E. coli* BL21 μέσω εμβάπτισης στείρου tip σε στοκ γλυκερόλης καλλιέργειας BL21 αποθηκευμένο στους -80 °C.
- Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας των 2 mL LB σε σωληνάκι τύπου Eppendorf.
- Επώαση υπό ανακίνηση στους 37 °C για 16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (8000 rpm / RT / 3 min).
- Απόρριψη υπερκειμένου. Επανεναιώρηση του ιζήματος σε 200 μL διαλύματος DNA Elution Buffer.
- Προσθήκη 200 μL BioFluid & Cell Buffer για χημική λύση των κυττάρων.
- Προσθήκη 20 μL Proteinase K προς απενεργοποίηση των ενδογενών βακτηριακών νουκλεασών.
- Επώαση στους 55 °C για 10 min.
- Προσθήκη 420 μL (ίσου όγκου) Genomic Binding Buffer.
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε στήλη Zymo-Spin™ IIC-XL προς συγκράτηση του ολικού βακτηριακού DNA και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min). Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος.
- Πλύση με προσθήκη 400 μL DNA Pre-Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min). Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος.
- Πλύση με προσθήκη 700 μL g-DNA Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min). Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος.
- Πλύση με προσθήκη 200 μL g-DNA Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min). Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος.
- Μεταφορά της στήλης σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Προσθήκη 50 μL DNA Elution Buffer στη στήλη και αναμονή 5 min προς ομοιόμορφο εμποτισμό της. Φυγοκέντρηση προς έκλυση του πλασμιδιακού DNA (8000 rpm / RT / 1 min).

B.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Miniprep)

A. Μέσω χρήσης των διαλυμάτων P1, P2, P3 του QIAGEN® Plasmid Purification kit:

- Λήψη μονήρους αποικίας από τρυβλίο με τη βοήθεια στείρου τιπ και εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας των 2 mL LB σε πλαστικό σωληνάκι τύπου Eppendorf.
- Επάωση υπό ανακίνηση στους 37 °C για 16 ώρες.
- Λήψη ποσότητας 200 µL από την καλλιέργεια προς διατήρηση στοκ γλυκερόλης.
- Φυγοκέντρηση της υπόλοιπης καλλιέργειας (8000 rpm / RT / 3 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου. Επανεναιώρηση του ιζήματος σε 100 µL κρούου διαλύματος P1.
- Προσθήκη 200 µL διαλύματος P2 προς αλκαλική λύση των κυττάρων. Ανάδευση με αναστροφή του σωληνακίου 5-6 φορές.
- Προσθήκη 150 µL κρούου διαλύματος P3 προς εξουδετέρωση του διαλύματος P2. Ανάδευση με αναστροφή του σωληνακίου 5-6 φορές.
- Φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 20 min).
- Μεταφορά του υπερκλειμένου όπου περιέχεται το πλασμιδιακό DNA, σε νέο σωληνάκι τύπου Eppendorf.
- Προσθήκη 450 µL ισοπροπανόλης προς κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA. Ανάδευση με αναστροφή. Επάωση σε RT για 15 min.
- Φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 10 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 µL 70% v/v αιθανόλη.
- Φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 10 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου και ξήρανση του ιζήματος σε ξηραντήρα τύπου SpeedVac.
- Αναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο ddH₂O ή TE.

B. Μέσω χρήσης του Monarch® Plasmid Miniprep Kit (New England Biolabs):

- Ακολούθηση των 4 πρώτων βημάτων της διαδικασίας B.4.A.
- Απόρριψη υπερκλειμένου. Επανεναιώρηση του ιζήματος σε 200 µL κρούου διαλύματος B1.
- Προσθήκη 200 µL διαλύματος B2 προς αλκαλική λύση των κυττάρων. Ανάδευση με αναστροφή 5-6 φορές.
- Προσθήκη 400 µL κρούου διαλύματος B3 προς εξουδετέρωση του διαλύματος P2. Ανάδευση με αναστροφή 5-6 φορές. Επάωση σε RT για 5 min.
- Φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 5 min).
- Μεταφορά του υπερκλειμένου σε στήλη προς συγκράτηση του πλασμιδιακού DNA και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος. Πλύση με προσθήκη 200 µl Plasmid Wash Buffer 1 στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).

- Πλύση με προσθήκη 400 µl Plasmid Wash Buffer 2 στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Μεταφορά της στήλης σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Προσθήκη 30 µl DNA Elution Buffer στη στήλη και αναμονή 1 min προς ομοιόμορφο εμποτισμό της. Φυγοκέντρηση προς έκλυση του πλασμιδιακού DNA (8000 rpm / RT / 1 min).

B.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία / μεγάλη κλίμακα (Midiprep / Maxiprep) μέσω χρήσης του QIAGEN® Plasmid Purification kit

Σημειώνεται πως το ακόλουθο πρωτόκολλο είναι κοινό για τις δύο διαδικασίες με μόνες διαφορές τις ποσότητες και τους χρόνους που διακρίνονται ως: Midiprep / Maxiprep.

- Λήψη μικρής ποσότητας της επιθυμητής βακτηριακής καλλιέργειας μέσω εμβάπτισης στείρου tip σε στοκ γλυκερόλης αποθηκευμένο στους -80 °C.
- Εμβολιασμός υγρής καλλιέργειας των 1 mL / 10 mL LB.
- Επάωση υπό ανακίνηση στους 37 °C για 5 ώρες.
- Εμβολιασμός καλλιέργειας 50 mL / 500 mL LB με τη μικρή καλλιέργεια.
- Επάωση υπό ανακίνηση στους 37 °C για 16 ώρες.
- Φυγοκέντρηση (6000 x g / 4 °C / 15 min).
- Επανεναιώρηση του βακτηριακού ιζήματος σε 4 mL / 10 mL διαλύματος P1.
- Προσθήκη 4 mL / 10 mL διαλύματος P2 προς αλκαλική λύση των κυττάρων. Ανάδευση με αναστροφή. Επάωση σε RT για 5 min.
- Προσθήκη 4 mL / 10 mL κρούου διαλύματος P3 προς εξουδετέρωση του διαλύματος P2. Ανάδευση με αναστροφή. Επάωση στον πάγο για 15 min / 20 min.
- Φυγοκέντρηση (17000 x g / 4 °C / 45 min).
- Μεταφορά του υπερκλειμένου και επανάληψη φυγοκέντρησης (17000 x g / 4 °C / 15 min).
- Εξισορρόπηση ιονανταλλακτικής στήλης (QIAGEN-tip 100 / QIAGEN-tip 500) απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με 4 mL / 10 mL διαλύματος QBT.
- Προσθήκη του υπερκλειμένου στη στήλη προς συγκράτηση του πλασμιδιακού DNA με ροή διαβαρύτητας.
- Πλύση της στήλης με 10 mL / 30 mL διαλύματος QC εις διπλούν.
- Προσθήκη 5 mL / 15 mL διαλύματος QF προς έκλυση του πλασμιδιακού DNA και συλλογή της ποσότητας σε στείρο σωλήνα τύπου Falcon.
- Κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη 3,5 mL / 10,5 mL ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου, ανάμιξη και άμεση φυγοκέντρηση (17000 x g / 4 °C / 30 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 2 mL / 5 mL 70% v/v αιθανόλη.

- Φυγοκέντρηση (17000 x g / 4 °C / 15 min).
- Απόρριψη υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος με αέρα.
- Αναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA σε κατάλληλο όγκο ddH₂O ή TE.

B.6 Απομόνωση και καθαρισμός τμήματος DNA από πήκτωμα αγαρόζης μέσω χρήσης του Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs)

- Περικοπή μέσω νυστεριού, της επιθυμητής μπάντας από το πήκτωμα αγαρόζης, με προσοχή ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ποσότητα πήγματος αγαρόζης που λαμβάνεται. Μεταφορά σε σωληνάκι τύπου Eppendorf και ζύγιση.
- Προσθήκη Gel Dissolving Buffer σε αναλογία όγκου 4:1 με το τμήμα πηκτώματος που απομονώθηκε (για τον όγκο πηκτώματος θεωρούμε πως 1 μL αντιστοιχεί σε 1 μg).
- Επώαση στους 50 °C για ~10 min με συχνή ανάδευση μέσω αναδευτήρα τύπου Vortex, μέχρι πλήρη διάλυση της αγαρόζης.
- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη προς συγκράτηση του DNA και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος. Πλύση με προσθήκη 200 μl DNA Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Μεταφορά της στήλης σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Προσθήκη 6-20 μl DNA Elution Buffer στη στήλη και αναμονή 1 min προς ομοιόμορφο εμποτισμό της. Φυγοκέντρηση προς έκλυση του DNA (8000 rpm / RT / 1 min).

Παρατηρήσεις:

- Ο όγκος έκλυσης εξαρτάται από την αρχική ποσότητα DNA (ένταση φωτεινότητας μπάντας) και από τις απαιτήσεις για συγκέντρωση προϊόντος.
- Η έκλυση συνήθως πραγματοποιείται σε 2 στάδια, με δύο διαδοχικές προσθήκες της μισής ποσότητας DNA Elution Buffer και φυγοκέντρηση, προς βελτιστοποίηση της ανάκτησης του DNA, καθώς η μέθοδος έχει γενικώς χαμηλή απόδοση.

B.7 Συγκέντρωση DNA με κατακρήμνιση αιθανόλης

- Προσθήκη 3 όγκων 100% v/v αιθανόλη και 1/10 όγκου οξικό νάτριο 3M pH 5.2 στο διάλυμα DNA προς συμπύκνωση.

- Επώαση στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα προς κατακρήμνιση του DNA.
- Φυγοκέντρηση (13000 rpm / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 30 min).
- Απόρριψη υπερκλειμένου και ξήρανση του ιζήματος σε SpeedVac.
- Αναδιάλυση σε κατάλληλο όγκο ddH₂O ή TE.

B.8 Καθαρισμός DNA

A. Μέσω φαινόλης-χλωροφορμίου:

- Συμπλήρωση όγκου με ddH₂O στο δείγμα προς καθαρισμό ως τα 500 μL .
- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης. Ισχυρή ανάδευση μέσω Vortex προς σχηματισμό γαλακτώματος.
- Φυγοκέντρηση (13000 rpm / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 10 min).
- Διατήρηση της άνω φάσης.
- Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων.
- Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων με προσθήκη χλωροφορμίου αντί φαινόλης.
- Συμπύκνωση DNA με κατακρήμνιση αιθανόλης (βλ. B.9).

B. Μέσω χρήσης του Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (5 μg) (New England Biolabs):

- Αραίωση του δείγματος προς καθαρισμό με προσθήκη DNA Cleanup Binding Buffer (2 όγκοι για dsDNA > 2kb και 5 όγκοι για dsDNA < 2kb).
- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη προς συγκράτηση του DNA και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Απόρριψη του αδέσμευτου κλάσματος. Πλύση με προσθήκη 200 μl DNA Wash Buffer στη στήλη και φυγοκέντρηση (8000 rpm / RT / 1 min).
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Μεταφορά της στήλης σε σωληνάκι τύπου Eppendorf. Προσθήκη 6-20 μl DNA Elution Buffer στη στήλη και αναμονή 1 min προς ομοιόμορφο εμποτισμό της. Φυγοκέντρηση προς έκλυση του DNA (8000 rpm / RT / 1 min).

B.9 Ενζυματική πέψη DNA

- Σύνθεση της αντίδρασης ενζυματικής πέψης όγκου 50 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Όγκος (μL)
DNA	x
10 x Buffer	5
Ένζυμο περιορισμού	1
ddH ₂ O	44 - x

- Επώαση στους 37 °C για 3 h.
- Έλεγχος μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης πυκνότητας.

Παρατηρήσεις:

- Ο όγκος x εξαρτάται από τη διαθέσιμη ποσότητα DNA και από τις απαιτήσεις για ποσότητα προϊόντος. Όμοια αναλογικά κλιμακώνονται τα συστατικά και ο συνολικός όγκος αντίδρασης. Οι όγκοι αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν κατά βάση στην εργασία ήταν 30 μL, 50 μL και 200 μL.
- Για τα ένζυμα με σήμανση TS (Time Saver, σύμφωνα με τη New England Biolabs) ο χρόνος επώασης μειώθηκε σε 1 h.
- Όλες οι ηλεκτροφορήσεις σε πήκτωμα αγαρόζης έγιναν με μάρτυρα μοριακού βάρους τον 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10 kb) (New England Biolabs) και με χρώση μέσω βρωμιούχου αιθιδίου.

B.10 Ένωση φορέα κλωνοποίησης και ενθέματος με χρήση T4 DNA λιγάσης

- Σύνθεση της αντίδρασης ένωσης, σε 3 διαφορετικές αναλογίες όγκου φορέα : ενθέματος, και σε όγκο 20 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Όγκος (μL)		
	1:2	1:5	1:10
Φορέας κλωνοποίησης	1	1	1
Ένθεμα	2	5	10
10x T4 Buffer	2	2	2
T4 λιγάση	1	1	1
dATP (10mM)	0.5	0.5	0.5
ddH ₂ O	14	11	6

- Επώαση στους 16 °C για 16 ώρες.

B.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

A. Με χρήση της Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), προς ποσοτική ενίσχυση τμήματος DNA:

- Σύνθεση της αντίδρασης όγκου 50 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική Συγκέντρωση
Μητρικό DNA	1 (τυπικά)	μεταβλητή
Μίγμα εκκινητών F/R (10mM)	2.5	200 μM
5x Phusion HF Buffer	10	1x
Phusion DNA Polymerase	0.5	1 Unit
dNTPs (10 mM)	1	1 mM (συνολικά)
DMSO	1.5	3%
ddH ₂ O	ως τα 50 μL	-

- Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα.

Στάδιο	Θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	98	30 sec	1
Αποδιάταξη	98	10 sec	
Υβριδισμός	μεταβλητή	30 sec	30x
Πολυμερισμός	72	30 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72	7 min	1
Διατήρηση	4	-	-

B. Με χρήση του Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs), προς γραμμικοποίηση φορέα κλωνοποίησης και προσθήκη επικαλύψεων στα άκρα φορέα κλωνοποίησης και ενθέματος:

- Σύνθεση της αντίδρασης όγκου 50 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική Συγκέντρωση
Μητρικό DNA	1 (τυπικά)	μεταβλητή
Μίγμα εκκινητών F/R (10mM)	2.5	200 μM
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	25	1x
ddH ₂ O	ως τα 50 μL	-

- Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	98	30 sec	1
Αποδιάταξη	98	10 sec	
Υβριδισμός	μεταβλητή	30 sec	30x
Πολυμερισμός	72	30 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72	2 min	1
Διατήρηση	4	-	-

- Προσθήκη 1 μL ενζύμου DpnI και επώαση στους 37 °C για 1 ώρα, ακολουθούμενη από επώαση στους 80 °C για 20 min, προς θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου.

Γ. Με χρήση της PfuTurbo DNA Polymerase (Agilent), προς Restriction Free Cloning:

- Σύνθεση της αντίδρασης όγκου 50 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική Συγκέντρωση
Μητρικό DNA (100 ng)	μεταβλητός	100 ng
Ένθεμα (10 ng/ μL)	μεταβλητός	100 ng
PfuTurbo DNA Polymerase	1	2.5 Units
10 \times Pfu Reaction Buffer	5	1x
dNTPs (10 mM)	1	1 mM (συνολικά)
ddH ₂ O	ως τα 50 μL	-

- Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	30 sec	1
Αποδιάταξη	95	30 sec	
Υβριδισμός	60	30 sec	30x
Πολυμερισμός	72	5 min	
Τελικός πολυμερισμός	72	7 min	1
Διατήρηση	4	-	-

Δ. Με χρήση της Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), προς έλεγχο πλασμιδιακού DNA σε βακτηριακές αποικίες (Colony PCR):

- Σύνθεση της αντίδρασης όγκου 25 μL σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική Συγκέντρωση
Μίγμα εκκινητών F/R (10mM)	1.25	100 μM
10x Standard <i>Taq</i> Reaction Buffer	2.5	1 x
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.125	0.625 Units
10x Pfu Reaction Buffer	5	1x
dNTPs (10 mM)	0.5	0.5 mM (συνολικά)
ddH ₂ O	ως τα 50 μL	-

- Λήψη μονήρους αποικίας από τρυβλίο με τη βοήθεια στείρου τιπ και εμβολιασμός αρχικά της άνωθεν αντίδρασης και εν συνεχεία υγρής καλλιέργειας των 0.5 mL LB σε πλαστικό σωληνάκι τύπου Eppendorf.
- Επώαση της υγρής καλλιέργειας στους 37 °C για 16 ώρες προς διατήρηση στοκ γλυκερόλης.
- Επώαση της αντίδρασης PCR σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
Αποδιάταξη	95	20 sec	
Υβριδισμός	μεταβλητή	40 sec	30x
Πολυμερισμός	68	1 min	
Τελικός πολυμερισμός	68	5 min	1
Διατήρηση	4	-	-

B.12 Αντίδραση Gibson Assembly μέσω του Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs)

- Σύνθεση της αντίδρασης ανάλογα με τον αριθμό τμημάτων DNA προς συναρμογή, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Συστατικό	Όγκος (μL)	
	2 τμήματα DNA	3 τμήματα DNA
Τμήμα 1 φορέας κλωνοποίησης	2.5	2.5
Τμήμα 2 ένθεμα 1	2.5	2.5
Τμήμα 3 ένθεμα 2	-	2.5
Gibson Assembly Master Mix 2x	5	7.5

- Επώαση στους 50 °C για 1 ώρα.

B.13 *In vitro* μεταγραφή και μετάφραση μέσω του PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis kit (New England Biolabs)

- Σύνθεση της αντίδρασης όγκου 25 µL στον πάγο, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα, προσθέτοντας τα συστατικά με τη σειρά που αναγράφονται.

Συστατικό	Προστιθέμενος όγκος (µL)
Solution A	10
Solution B	7.5
RNase Inhibitor	1
ddH ₂ O	ως τα 25 µL
DNA (1 µg)	x

- Επώαση στους 37 °C για 3 ώρες.

B.14 Ενζυμική αντίδραση τρεχαλάσης

- Λήψη 3 µL προϊόντος της αντίδρασης παραγωγής τρεχαλάσης από το σύστημα *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης.
- Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος τρεχαλόζης (60 mM) και κιτρικού οξέος, που ρυθμίζει το pH της αντίδρασης στο 5,9.
- Επώαση στους 37 °C για 15 min.
- Αραίωση του διαλύματος σε διπλάσιο όγκο με προσθήκη ddH₂O και ισχυρή ανάδευση με Vortex προς πλήρη αναδιάλυση του ιζήματος.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της παραχθείσας γλυκόζης με τη μέθοδο DNS (B.16)

B.15 Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω της μεθόδου DNS

- Προσθήκη 1:1 όγκου DNS στο διάλυμα γλυκόζης προς προσδιορισμό.
- Βρασμός για 5 min.
- Αραίωση 1:5 του συνολικού όγκου του διαλύματος με ddH₂O.
- Φωτομέτρηση του δείγματος στα 590 nm.

B.16 Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω του αντιδραστηρίου Benedict's

- Προσθήκη 1:1 όγκου από αντιδραστήριο Benedict's στο διάλυμα γλυκόζης προς προσδιορισμό.
- Βρασμός για 5 min.

B.17 Σχεδιασμός του Gibson Assembly

Το Gibson Assembly ήταν η μέθοδος που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση της πλειοψηφίας των ακολουθιών για αυτή την εργασία. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στην ευκολία σχεδιασμού και εκτέλεσης της μεθόδου, στο ότι παρέχει τη δυνατότητα ένωσης περισσότερων από δύο τμημάτων DNA ταυτόχρονα, ενώ επίσης δεν αφήνει “ουλές” μεταξύ των τμημάτων που ενώνονται.

Οι εκκινήτες για την προσθήκη των επικαλύψεων και η διαδικασία για το Gibson Assembly σχεδιάστηκαν στο online λογισμικό NEBuilder Assembly Tool v2.2.3 (New England Biolabs) [55]. Ενδεικτικά παρατίθεται παρακάτω η σύνοψη των παραμέτρων σχεδιασμού για το Gibson Assembly ενός εκ των τεσσάρων toehold switches με TreA-a. Ο σχεδιασμός ήταν ο ίδιος και για τις υπόλοιπες ακολουθίες.

NEBuilder[®] v2.2.3
Assembly Tool

FEEDBACK ? HELP HISTORY

Build Summary Settings Load/Save Resources

Toehold Switch 3
Created: 1/16/2019, 2:52:45 PM

Notes

- Primer TreA-a_rev contains a run of 4+ repeats of a mono/di/trinucleotide.

Build Settings

- Product/Kit: #E5520 NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit
- Minimum Overlap: 30 nt
- Circularize?: Yes
- PCR Polymerase/Kit: Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
- PCR Primer Concentration: 500 nM
- Minimum Primer Length: 18 nt

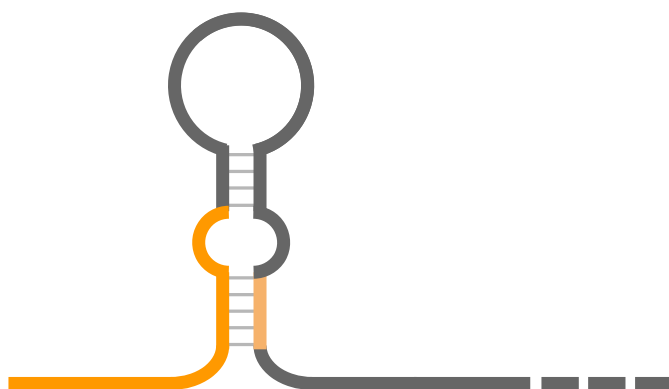
TreA-a
227
204
3638 bp
pGEM-3Zf(+)

EΙΚΟΝΑ B.18.1: Παράμετροι σχεδιασμού του Gibson Assembly για το toehold switch #3 με TreA-a στο NEBuilder Assembly Tool.

Ο έλεγχος των σχεδιασμένων ακολουθιών ως προς την ορθότητα του πλαισίου ανάγνωσης και η κατασκευή των αντίστοιχων χαρτών για τα πλασμίδια που σχεδιάστηκαν, προς οποιοδήποτε περαιτέρω επεξεργασία έγιναν μέσω του λογισμικού SnapGene (GSL Biotech) [56].

Γ.1 *In silico* σχεδιασμός των toehold switches και trigger RNAs

Ο μηχανισμός toehold switch στοχεύει στην αναγνώριση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας RNA μήκους 30 βάσεων, του trigger RNA. Εν προκειμένω, στόχος είναι η ανίχνευση του ιού MERS-CoV, άρα κάθε trigger RNA αντιστοιχεί σε 30 βάσεις από το γονιδίωμα του. Το γονιδίωμα του MERS-CoV έχει μήκος περίπου 30.000 νουκλεοτιδίων, και μεγάλο μέρος αυτού αντιστοιχεί σε αλληλουχίες που απαντώνται και σε άλλους οργανισμούς, κυρίως συγγενικούς ιούς. Προκειμένου λοιπόν να ελαχιστοποιηθεί το υπολογιστικό φορτίο, αλλά και να αυξηθεί η ειδικότητα ανίχνευσης, εξετάστηκαν μόνο οι συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού, που είναι μοναδικές για τον ιό και δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταλλάξεις. Κάθε τμήμα 30 βάσεων από τις συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού αντιστοιχεί σε ένα trigger RNA. Κάθε trigger RNA συμπληρωματικά, αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό toehold switch που το ανιχνεύει. Με αυτή τη βάση, σχεδιάστηκαν όλα τα δυνατά ζεύγη toehold switch – trigger RNA.



ΕΙΚΟΝΑ Γ.1.1: Κάθε toehold switch έχει μία προκαθορισμένη (γκρι) και μία μεταβλητή (πορτοκαλί) δομή. Για κάθε trigger RNA προς ανίχνευση, απαιτείται να μεταβληθεί μόνο το toehold domain του switch (αριστερά) και η σύντομη συμπληρωματική περιοχή του στον κορμό (δεξιά).

Κάθε προκύπτον toehold switch αξιολογήθηκε με βάση θερμοδυναμικά κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά εξετάζουν:

- την ικανότητα του toehold switch να παραμένει σε κατάσταση ON απουσία του trigger RNA

- την ικανότητα του trigger RNA να προσδεθεί στο toehold switch, ευνοώντας το αυθόρμητο ξετύλιγμά του και τη μετάβαση σε κατάσταση OFF
- την ικανότητα πρόσδεσης του ριβοσώματος στο RBS ενός OFF toehold switch
- τη θερμοδυναμική απαγόρευση πρόσδεσης ενός μορίου toehold switch σε ένα δεύτερο
- τη θερμοδυναμική απαγόρευση πρόσδεσης ενός μορίου trigger RNA σε ένα δεύτερο

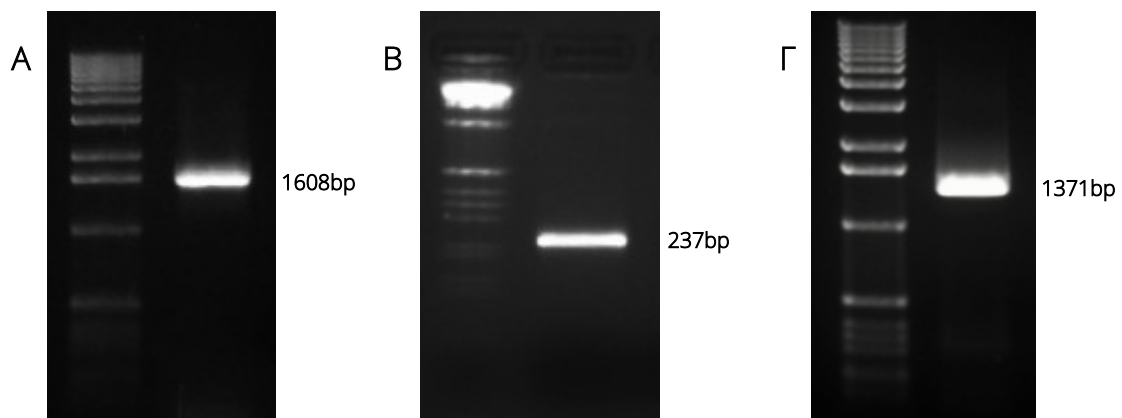
Μετά την εφαρμογή των θερμοδυναμικών κριτηρίων, κάθε toehold switch αντιστοιχεί σε ένα σύνολο 5 ενεργειών, μία για καθένα από τα παραπάνω κριτήρια. Αυτά τα δεδομένα δε μπορούν να δώσουν μία καθολική απάντηση ως προς το switch που προτιμάται, επειδή κανένα switch δε θα έχει τις πιο επιθυμητές τιμές για όλα τα κριτήρια. Χρειάζεται λοιπόν να εισαχθεί μια μέθοδος βαθμολόγησης, προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η καταλληλότητα του κάθε switch. Για αυτό το σκοπό, εκπαιδεύτηκε ένα νευρωνικό δίκτυο, με πειραματικά δεδομένα από την απόδοση των toehold switches που ελέγχθηκαν από τους Green *et al.* Έτσι, κάθε toehold switch βαθμολογήθηκε και με βάση αυτή τη βαθμολογία, όλα τα δυνατά ζεύγη toehold switch – trigger RNA κατατάχθηκαν. Τα 4 πιο δόκιμα εξ αυτών (toehold switch #3, #7, #8, #16) επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν *in vitro*.

Σημειώνεται πως όλες οι αλληλουχίες που σχεδιάστηκαν συντέθηκαν μέσω του προγράμματος gBlocks® Gene Fragments της εταιρείας IDT (Integrated DNA Technologies).

Γ.2 Κλωνοποίηση

Γ.2.1 Απομόνωση των γονιδίων TreA, TreA-a & TreA-b

Το αρχικό στάδιο στην ανάπτυξη του συστήματος ήταν η απομόνωση του γονιδίου της τρεχαλάσης (TreA), καθώς και των δύο κλασμάτων της (TreA-a & TreA-b). Τα γονίδια απομονώθηκαν μέσω PCR, από το γενωμικό DNA των *E. coli* BL21 όπου η τρεχαλάση απαντάται φυσιολογικά.



ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.1.1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για τα προϊόντα των PCR απομόνωσης της TreA (A), της TreA-a (B) και της TreA-b (Γ). Τα επιθυμητά προϊόντα σε κάθε αντίδραση ήταν μοναδικά.

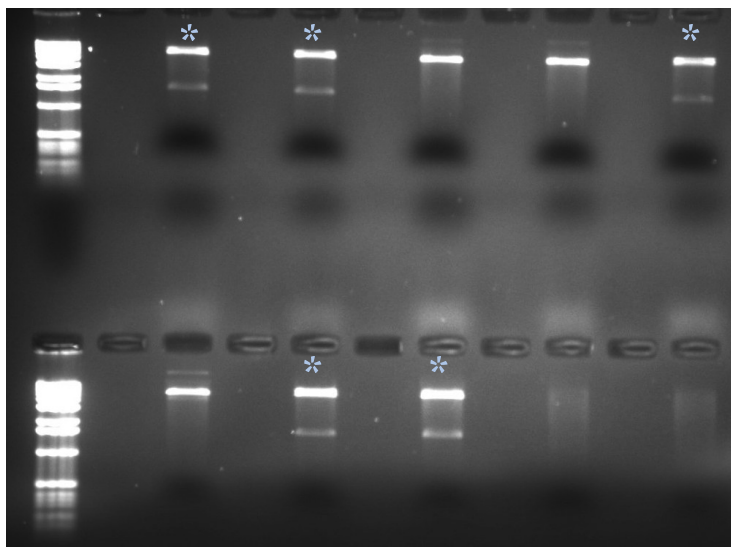
Μάρτυρας μοριακών βαρών: 1kb

Γ.2.2 Κλωνοποίηση της TreA μέσω ligation

Η διαδικασία συνεχίστηκε για την TreA, προς κλωνοποίηση μέσω συμβατικού ligation. Ο στόχος ήταν η έκφρασή της, για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού ενεργότητας του ενζύμου, αλλά και για να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας στους ελέγχους των toehold switches.

Ως φορέας κλωνοποίησης επιλέχθηκε ο pET-15b (Novagene), που αποτελεί ένας εύχρηστος φορέας για επαγωγίμη έκφραση πρωτεϊνών, ενώ επίσης επισυνάπτει ομάδα 6 καταλοίπων ιστιδίνης (6xHis) στο N- άκρο της προς κλωνοποίηση πρωτεΐνης, διευκολύνοντας τον καθαρισμό της. Τα ένζυμα περιορισμού που επιλέχθηκαν για την κλωνοποίηση ήταν τα BamHI και NdeI. Στο στάδιο του ligation, δοκιμάστηκαν 3 αναλογίες μεταξύ φορέα κλωνοποίησης και ενθέματος (1:2, 1:5 και 1:10). Αποικίες σχηματίστηκαν μόνο στο τρυβλίο που αντιστοιχούσε στην αναλογία 1:10. Κατόπιν ελέγχου

μέσω πέψης (με BamHI και NdeI) στο πλασμιδιακό DNA 10 αποικιών, διαπιστώθηκε πως 5 εξ αυτών είχαν λάβει ακέραιο το επιθυμητό ένθεμα.

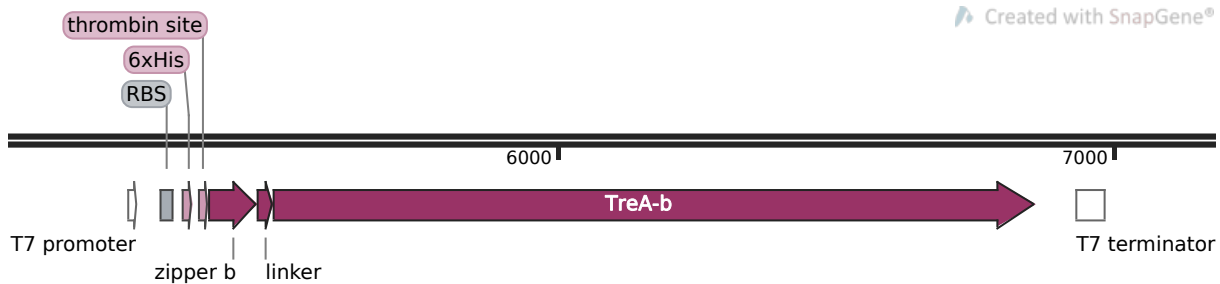


ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.2.1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για έλεγχο πλασμιδιακού DNA 10 αποικιών κατόπιν πέψης με BamHI και NdeI. Οι σημασμένες αποικίες έχουν λάβει σωστά το επιθυμητό ένθεμα (TreA). Μάρτυρας μοριακών βαρών: 1kb

Γ.2.3 Κλωνοποίηση της TreA-b / zipper-b μέσω Gibson Assembly

Στην προκειμένη κλωνοποίηση στόχος ήταν η κατασκευή ενός πλασμιδίου που θα εκφράζει χιμαιρικά την TreA-b και το ένα εκ των δύο τμημάτων του φερμουάρ λευκίνης που αναλαμβάνει την επανένωση του ενζύμου (zipper-b). Η μέθοδος κλωνοποίησης που επιλέχθηκε ήταν αυτή του Gibson Assembly, εφόσον επιθυμούσαμε την κλωνοποίηση δύο ενθεμάτων, χωρίς “ουλές” ανάμεσά τους.

Ο φορέας κλωνοποίησης γραμμικοποιήθηκε μέσω πέψης με τα ένζυμα BamHI και NdeI. Η αλληλουχία του zipper-b κατασκευάστηκε μέσω σύνθεσης, με 36bp επικάλυψη με το φορέα στο 5' άκρο της, για τις ανάγκες του Gibson Assembly, και καταρροϊκά της ακολουθούν σε σειρά 5' - 3': 87bp που κωδικοποιούν το zipper-b, 27bp που κωδικοποιούν το σύνδεσμο γλυκίνης-σερίνης (linker) και 30bp επικάλυψης με το 5' άκρο της TreA-b. Ο σύνδεσμος τοποθετήθηκε ανάμεσα στις δύο ακολουθίες με στόχο να προσφέρει μεγαλύτερο εύρος και ευκολία κίνησης στο zipper-b, άρα και να καταστήσει αποτελεσματικότερη τη λειτουργία του. Μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε και η επέκταση του 3' άκρου της TreA-b κατά 30bp, ώστε επίσης να επικαλύπτει το φορέα.



ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.3.1: Η λογική ακολουθία των BioBricks για την κλωνοποίηση της TreA-b / zipper-b.

Αρχικά, η αντίδραση Gibson Assembly πραγματοποιήθηκε με βάση της οδηγίες του κατασκευαστή του kit (New England Biolabs), με την εξής διαδικασία:

- Πέψη του φορέα προς γραμμικοποίησή του, απομόνωση και καθαρισμός του από πήκτωμα αγαρόζης και ποσοτικοποίησή του.
- Ενίσχυση της TreA-b και επέκτασή της με επικάλυψη στο φορέα μέσω PCR, καθαρισμός και ποσοτικοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης.
- Gibson Assembly με 0.2 pmoles συνολικά από όλα τα τμήματα DNA προς ένωση, σε ποσοτική αναλογία 1:2 (φορέας : ενθέματα).

Αυτή η διαδικασία δεν απέδωσε αποικίες στο στάδιο του βακτηριακού μετασχηματισμού. Δοκιμάστηκε έτσι η εναλλακτική αναλογία 1:5:2 για φορέα : zipper-b : TreA-b, που προέκυψε με βάση πως το τμήμα του zipper-b είναι περίπου 6-7 φορές μικρότερο σε μήκος από την TreA-b. Αυτή η αλλαγή ωστόσο δεν επέφερε ανάπτυξη αποικιών.

Μία ακόμη μεταβλητή που εξετάστηκε ήταν ο χρόνος επώασης για την αντίδραση Gibson Assembly, που αυξήθηκε από 50 λεπτά σε 4 ώρες, χωρίς ωστόσο το επιθυμητό αποτέλεσμα.

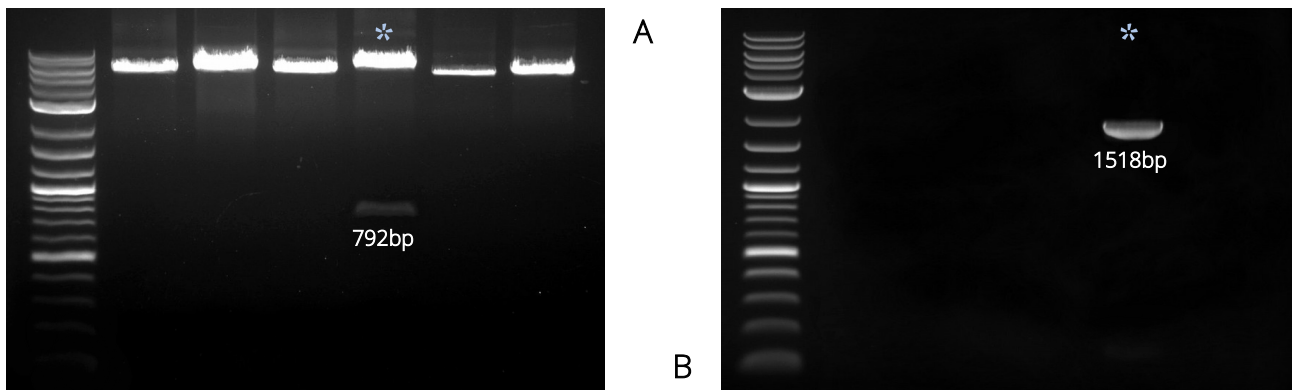
Με βάση το ότι η αλατότητα και οι ενζυμικές δραστηριότητες (κυρίως της εξωνουκλεάσης) στο διάλυμα της αντίδρασης Gibson Assembly θα μπορούσαν ενδεχομένως να φανούν τοξικές για τα δεκτικά κύτταρα, ενώ ακόμη το πλασμιδιακό DNA που προκύπτει σε αυτή την αντίδραση αναμένεται να βρίσκεται σε πολύ χαμηλή ποσότητα, δοκιμάστηκε επίσης η συμπύκνωσή του με κατακρήμνιση αιθανόλης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αναπτυχθούν μεν αποικίες, οι οποίες ωστόσο απέδιδαν ελάχιστο πλασμιδιακό DNA κατά την απομόνωσή του, το οποίο δεν αντιστοιχούσε στο επιθυμητό μοριακό βάρος.

Υπό το ίδιο πλαίσιο, προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν τοξικότητα για τα κύτταρα από το διάλυμα της αντίδρασης, δοκιμάστηκε να αραιωθεί 1:4 το προϊόν της αντίδρασης πριν προστεθεί στα δεκτικά βακτήρια στο μετασχηματισμό, κάτι που συνιστάται και από τον κατασκευαστή του kit. Αυτή η αλλαγή έγινε για την αντίδραση με αναλογία 1:5:2. Με αυτό τον τρόπο αναπτύχθηκαν αποικίες, οι οποίες ωστόσο είτε δεν περιείχαν και τα δύο ενθέματα, είτε εμφάνιζαν διαγραφή ενός τμήματος του φορέα κλωνοποίησης, καταρροϊκά της TreA-b. Αυτό πιστοποιήθηκε καθώς η πέψη των αντίστοιχων πλασμιδίων με ένζυμο περιορισμού που περιέχονται καταρροϊκά της TreA-b στο φορέα (πχ HindIII),

δεν έδινε προϊόντα. Απώλεια αυτού του τμήματος του φορέα σήμαινε απώλεια και της αλληλουχίας τερματισμού της μεταγραφής, καθιστώντας πρακτικά αναποτελεσματική την κλωνοποίηση.

Τέλος, δοκιμάστηκε η παράλειψη του καθαρισμού του προϊόντος της PCR ενίσχυσης της TreA-b, γεγονός που σήμαινε πως πλέον δεν ήταν εφικτή η μέτρηση της συγκέντρωσης της TreA-b, άρα έτσι ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο B.12 και αυξήθηκαν οι ποσότητες του κάθε τμήματος DNA στην αντίδραση ένωσης. Αυτή η αλλαγή επέφερε την ανάπτυξη αποικιών και την επιτυχή κατασκευή του επιθυμητού πλασμιδίου.

Όπως και στις υπόλοιπες κλωνοποιήσεις αυτής της εργασίας, ο έλεγχος του πλασμιδιακού DNA των εξεταζόμενων αποικιών σε κάθε κλωνοποίηση έγινε μέσω απομόνωσής του σε μικρή κλίμακα και πέψης του με ένζυμα περιορισμού. Εν προκειμένω, επιλέχθηκαν τα ένζυμα HindIII και NotI. Το πρώτο, κόβει σε ένα σημείο στο φορέα, καταρροϊκά των ενθεμάτων, άρα ελέγχει την πιθανότητα διαγραφής τμήματός του. Το δεύτερο ένζυμο, κόβει σε ένα σημείο εντός ενός εκ των δύο ενθεμάτων (TreA-b). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ωστόσο ότι και το άλλο ένθεμα είχε κλωνοποιηθεί σωστά, ο έλεγχος του πλασμιδιακού DNA των αποικιών έγινε και με colony PCR. Τα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους ήταν σύμφωνα.



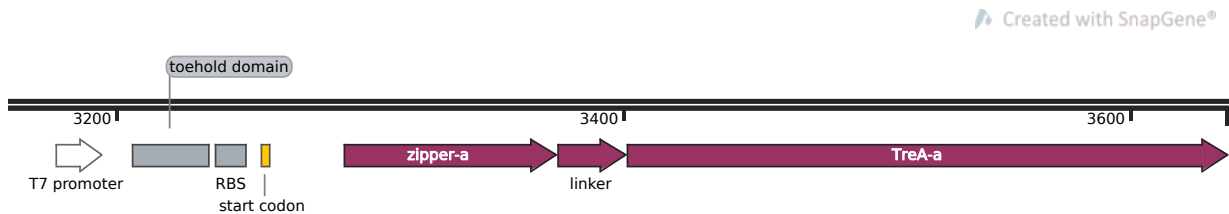
ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.3.2: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για έλεγχο πλασμιδιακού DNA 6 αποικιών κατόπιν πέψης με HindIII και NotI (A) και κατόπιν colony PCR (B). Η σημασμένη αποικία έχει λάβει σωστά και τα δύο επιθυμητά ενθέματα (zipper-b και TreA-b).

Μάρτυρας μοριακών βαρών: 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)

Γ.2.4 Κλωνοποίηση των toehold switches με TreA-a ως πρωτεΐνη-μάρτυρα

Για την κλωνοποίηση των toehold switches επιλέχθηκε ο φορέας pGEM-3Zf(+) (Addgene). Η μέθοδος κλωνοποίησης που επιλέχθηκε ήταν αυτή του Gibson Assembly, εφόσον επιθυμούσαμε την κλωνοποίηση δύο ενθεμάτων, χωρίς “ουλές” ανάμεσά τους.

Ο φορέας κλωνοποίησης γραμμικοποιήθηκε μέσω PCR και προστέθηκαν επικαλύψεις στο 3' άκρο του με το πρώτο ένθεμα. Η αλληλουχία του toehold switch με το zipper-a (πρώτο ένθεμα) κατασκευάστηκε μέσω σύνθεσης, και πάλι με ένα σύνδεσμο γλυκίνης-σερίνης (linker) και με επικάλυψη στο δεύτερο ένθεμα. Καταρροϊκά, ακολούθησε η TreA-a (δεύτερο ένθεμα). Μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε και η επέκταση των άκρων της TreA-a, ώστε να επικαλύπτει το φορέα και το πρώτο ένθεμα.

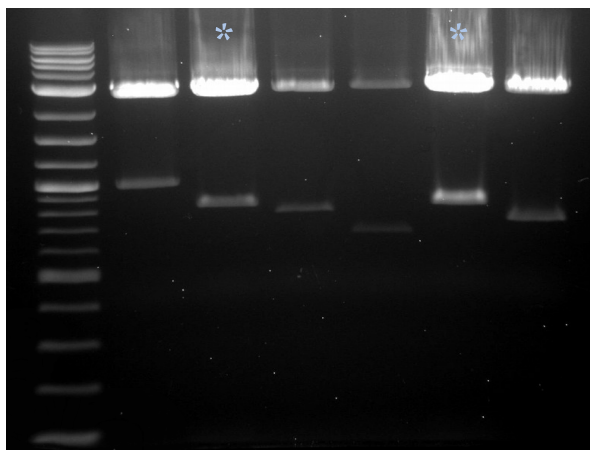


ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.4.1: Η λογική ακολουθία των BioBricks για την κλωνοποίηση των toehold switches με TreA-a.

Όπως και στην κλωνοποίηση του zipper-a / TreA-b, υπήρξε το πρόβλημα πως δεν αναπτύσσονταν αποικίες μετά το στάδιο του μετασχηματισμού. Δοκιμάστηκαν διάφορες εναλλακτικές (διαφορετικές αναλογίες φορέα : ενθεμάτων, αύξηση χρόνου αντίδρασης Gibson Assembly, διαφορετικές διαδικασίες καθαρισμού και απομόνωσης των τμημάτων DNA, αύξηση ποσότητας των τμημάτων DNA, αραιώση 1:4 της αντίδρασης Gibson Assembly πριν το μετασχηματισμό, χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης των τρυβλίων για περισσότερο χρόνο), χωρίς να καταλήξουν σε ανάπτυξη αποικιών. Επίσης δοκιμάστηκαν διαφορετικά είδη δεκτικών κυττάρων (*E. coli* JM109 και XL1-Blue). Η μόνη διαδικασία με την οποία προέκυψαν αποικίες ήταν η συμπύκνωση του DNA πριν το μετασχηματισμό μέσω κατακρήμνισης με αιθανόλη, που όπως και προηγουμένως, δεν ήταν οι επιθυμητές. Δοκιμάζοντας τη μέθοδο που εν τέλει ήταν η αποτελεσματική για την κλωνοποίηση του zipper-a / TreA-b, υπήρξε σχηματισμός αποικιών με εξαιρετικά αργό ρυθμό ανάπτυξης, απαιτώντας διπλάσιο χρόνο επώασης από ό,τι συνήθως, οι οποίες επίσης δεν ήταν οι επιθυμητές.

Η κρίσιμη διαφορά ωστόσο μεταξύ αυτής της διαδικασίας κλωνοποίησης και της προηγούμενης, ήταν το μήκος των επικαλύψεων. Στην κλωνοποίηση του zipper-a / TreA-b, οι επικαλύψεις μεταξύ των τμημάτων ήταν 30bp, ενώ εν προκειμένω ήταν 24bp. Αυτό εν τέλει φάνηκε να ενώνει ασθενώς τα τμήματα μεταξύ τους, χωρίς να δομείται κυκλικό πλασμίδιο. Η αποτελεσματική κλωνοποίηση επετεύχθη αυξάνοντας τις επικαλύψεις στις 30bp.

Εν προκειμένω, για τον έλεγχο του πλασμιδιακού DNA των αποικιών επιλέχθηκε πέψη με το ένζυμο PvuII, που κόβει το φορέα σε δύο σημεία, άρα και σε δύο τμήματα. Το μικρότερο εκ των δύο, είναι αυτό εντός του οποίου αναμένεται να ενσωματωθούν τα ενθέματα. Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω τα δεδομένα για ένα εκ των τεσσάρων toehold switches.



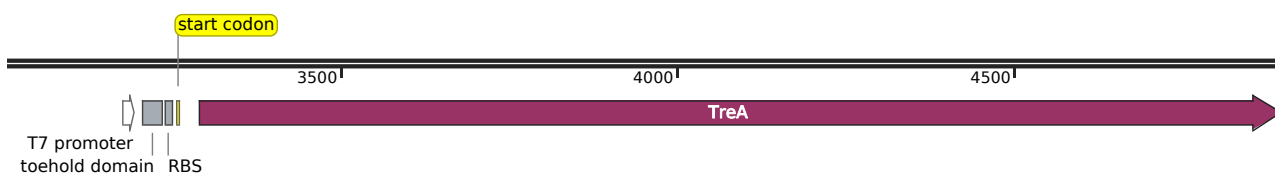
ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.4.2: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για έλεγχο πλασμιδιακού DNA 6 αποικιών για το toehold switch #3, κατόπιν πέψης με PvuII. Οι σημασμένες αποικίες έχουν λάβει σωστά και τα δύο επιθυμητά ενθέματα.

Μάρτυρας μοριακών βαρών: 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)

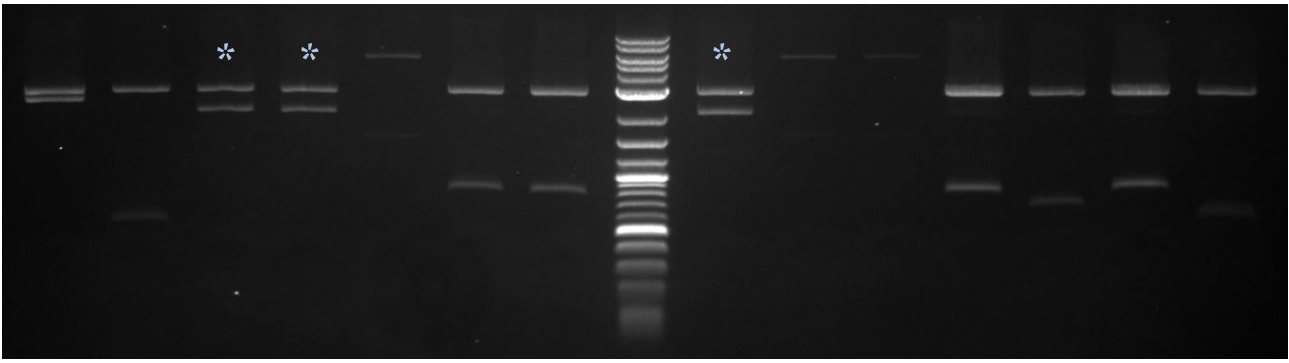
Γ.2.5 Κλωνοποίηση των toehold switches με TreA ως πρωτεΐνη-μάρτυρα

Τα toehold switches με ολόκληρη την τρεχαλάση ως μάρτυρα δομήθηκαν με βάση τα αντίστοιχα toehold switches με TreA-a. Πιο συγκεκριμένα, καθένα εξ αυτών γραμμικοποιήθηκε μέσω PCR, ώστε να ενισχυθεί όλο το πλασμίδιο εκτός της αλληλουχίας zipper-a, του συνδέσμου και της TreA-a. Έτσι, ουσιαστικά αυτή η περιοχή διαγράφεται και κατά το Gibson Assembly αντικαθίσταται από την TreA. Όπως και τις προηγούμενες κλωνοποιήσεις, επιτυχές Gibson Assembly πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 30bp επικαλύψεων με το φορέα στα άκρα του γονιδίου της τρεχαλάσης.

Created with SnapGene®



ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.5.1: Η λογική ακολουθία των BioBricks για την κλωνοποίηση των toehold switches με TreA.



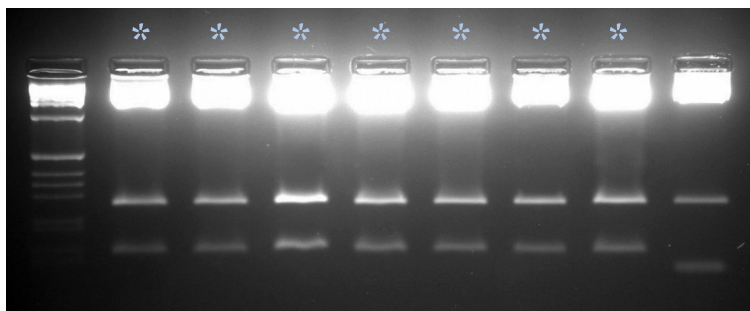
ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.5.2: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v για έλεγχο πλασμιδιακού DNA 7 αποικιών για τα toehold switch #3 (αριστερά) και #7 (δεξιά), κατόπιν πέψης με PvuII. Οι σημασμένες αποικίες αντιστοιχούν σε σωστή κλωνοποίηση.

Μάρτυρας μοριακών βαρών: 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)

Γ.2.6 Κλωνοποίηση των trigger RNAs

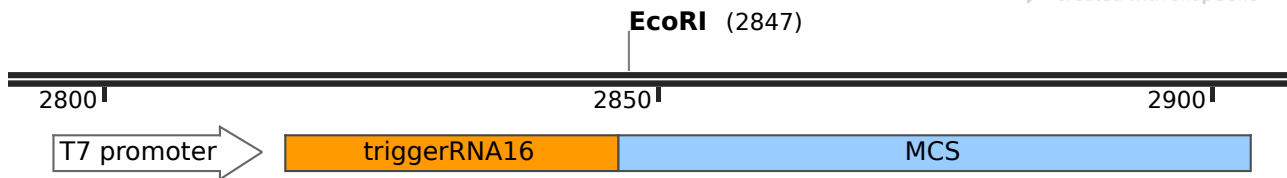
Και σε αυτή την κλωνοποίηση επιλέχθηκε ο φορέας pGEM-3Zf(+), καθώς διαθέτει υποκινητή T7, όπου καταρροϊκά τοποθετήθηκε το κάθε trigger RNA. Τα trigger RNAs έχουν μήκος μόλις 30 βάσεων. Εκατέρωθεν αυτών των 30bp, στην ακολουθία προς σύνθεση, προστέθηκαν 48bp επικάλυψης με το φορέα, με στόχο την κλωνοποίηση μέσω Gibson Assembly. Αυτό ωστόσο δεν επετεύχθη με καμία εκ των διαδικασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω στο κεφάλαιο, παρόλο που οι επικαλύψεις εν προκειμένω ήταν ακόμη μεγαλύτερες. Για αυτό το λόγο, αντί του Gibson Assembly, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Restriction Free Cloning, με την οποία και επετεύχθη η κλωνοποίηση.

Για τον έλεγχο του πλασμιδιακού DNA των αποικιών επιλέχθηκε πέψη με τα ένζυμα PvuII και EcoRI, που κόβουν το φορέα σε δύο και ένα σημεία αντίστοιχα, άρα συνολικά σε τρία τμήματα. Το μικρότερο εκ των τριών (115bp), είναι αυτό εντός του οποίου αναμένεται να ενσωματωθεί το ένθεμα (επιπλέον 30bp). Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω τα δεδομένα για ένα εκ των τεσσάρων trigger RNAs.



ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.6.1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 4% w/v για έλεγχο πλασμιδιακού DNA 8 αποικιών για το trigger RNA #8, κατόπιν πέψης με PvuII και EcoRI. Οι σημασμένες αποικίες αντιστοιχούν σε σωστή κλωνοποίηση.

Μάρτυρας μοριακών βαρών: 1kb



ΕΙΚΟΝΑ Γ.2.6.2: Η λογική ακολουθία των BioBricks για την κλωνοποίηση των trigger RNAs.

Γ.2.7 Αλληλούχιση DNA

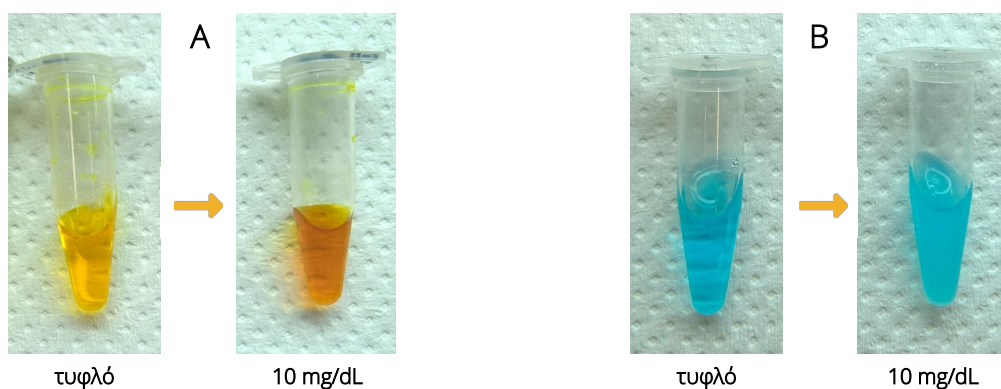
Προκειμένου να ελεγχθεί η πιστότητα των κλωνοποιούμενων αλληλουχιών και προκειμένου να αποκλεισθεί η πιθανότητα μετατόπισης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης σε κάποιο toehold switch, οι παραπάνω κλώνοι ελέγχθηκαν μέσω αλληλούχισης DNA. Για όσα πλασμίδια κατασκευάστηκαν πάνω στο φορέα pGEM-3Zf(+), χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές M13F(-47) και M13R(-27), ενώ για το φορέα pET-15b οι T7 και T7 Term. Επιβεβαιώθηκε πως όλες οι ακολουθίες ήταν οι επιθυμητές, εκτός του toehold switch #16 με TreA-a ως μάρτυρα. Συνεπώς, αυτός ο διακόπτης δεν ελέγχθηκε παρακάτω ως προς τη λειτουργικότητά του.

Γ.3 Ενζυμική δραστηριότητα τρεχαλάσης

Γ.3.1 Επιλογή μεθόδου πειραματικού προσδιορισμού γλυκόζης

Τελικό στάδιο της συνολικής μεθόδου είναι η ανίχνευση της γλυκόζης που παράγεται από την τρεχαλάση των ενεργοποιημένων toehold switches, μέσω γλυκομέτρου. Για τους εργαστηριακούς ελέγχους ωστόσο κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, προτιμήθηκε ο προσδιορισμός της γλυκόζης μέσω DNS και αντιδραστήριου Benedict's, λόγω του σημαντικά χαμηλότερου κόστους τους συγκριτικά με τα strips του γλυκομέτρου.

Το εμπορικό γλυκόμετρο που χρησιμοποιήθηκε εν προκειμένω, ήταν το Accu-Chek Instant (Roche). Το κατώτατο όριο ανίχνευσής του, όπως και των περισσότερων εμπορικών γλυκομέτρων, βρίσκεται στα 10 mg/dL γλυκόζης. Ουσιαστικά, θετική διάγνωση σημαίνεται για κάθε συγκέντρωση παραχθείσας γλυκόζης που ξεπερνά το κατώτατο όριο ανίχνευσης του γλυκομέτρου. Με αυτή τη βάση, ελέγχθηκε η απόδοση του DNS και του αντιδραστήριου Benedict's για αυτή τη συγκέντρωση.

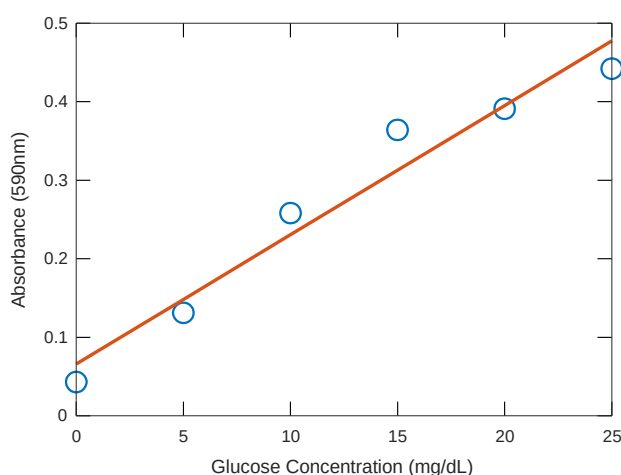


ΕΙΚΟΝΑ Γ.3.1.1: Η μεταβολή στα αντιδραστήρια DNS (A) και Benedict's (B) για 10 mg/dL γλυκόζης.

Παρατηρείται εύκολα πως η αλλαγή είναι πιο ευδιάκριτη για το DNS, καθώς το αντιδραστήριο Benedict's έχει μόλις θολώσει ελάχιστα. Κρίνοντας επίσης από το ότι είναι επιθυμητή η δυνατότητα φωτομέτρησης των δειγμάτων, για ακριβέστερη μοντελοποίηση της συμπεριφοράς του συστήματος, προτιμήθηκε η χρήση της μεθόδου του DNS για τις παρακάτω μελέτες.

Γ.3.2 Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

Η καμπύλη αναφοράς γλυκόζης σχεδιάστηκε για διαλύματα γλυκόζης 0 – 25 mg/dL κατόπιν αντίδρασης με DNS και φωτομέτρησης.



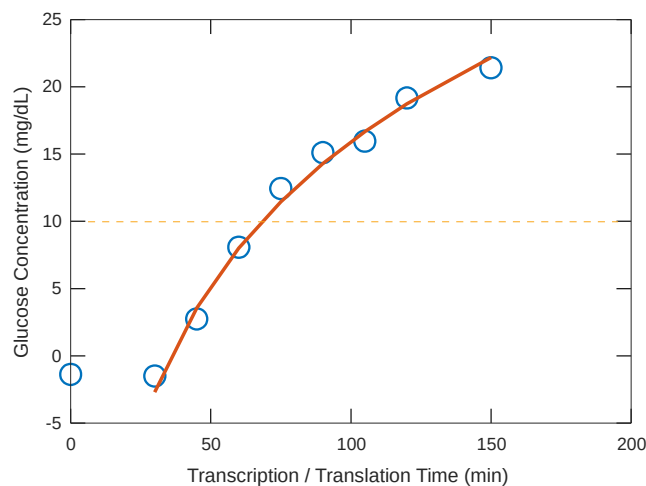
ΕΙΚΟΝΑ Γ.3.2.1: Καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκόζης με τη μέθοδο του DNS.

Η προκύπτουσα σχέση με προσαρμογή βέλτιστης ευθείας (δείκτης $R^2=0.9559$) στα πειραματικά δεδομένα είναι:

$$y = 0.0657 + 0.0165 \cdot x$$

Γ.3.3 Πρόβλεψη κατώτατου χρονικού ορίου διάγνωσης

Προκειμένου να προβλεφθεί η συμπεριφορά του συστήματος των toehold switches με μάρτυρα την τρεχαλάση, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δραστηριότητας του ενζύμου ως ένα πρότυπο toehold switch. Προσομοιάζοντας λοιπόν ένα toehold switch στην κατάσταση OFF, έγινε έκφραση της τρεχαλάσης όπως κλωνοποιήθηκε στο plasmid A, στο σύστημα *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης. Λαμβάνοντας δείγματα από την αντίδραση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου σε κάθε χρονική στιγμή, μέσω ανίχνευσης της παραγόμενης γλυκόζης με τη μέθοδο DNS και φωτομέτρησης των δειγμάτων. Κάθε απορρόφηση αντιστοιχίζεται στην αντίστοιχη συγκέντρωση γλυκόζης με βάση τη σχέση της καμπύλης βαθμονόμησης της γλυκόζης (Γ.4.2).



ΕΙΚΟΝΑ Γ.3.3.1: Συγκέντρωση παραγόμενης γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου που απαιτείται για την έκφραση της τρεχαλάσης. Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει το όριο ανίχνευσης του γλυκομέτρου.

Το διάγραμμα παρουσιάζει προσαρμογή στην ακόλουθη λογαριθμική σχέση (δείκτης $R^2=0.9755$):

$$y = 15.45 \cdot \ln(x) - 55.24$$

Με βάση την παραπάνω σχέση, για το όριο ανίχνευσης των 10 mg/dL απαιτούνται 69 λεπτά μεταγραφής – μετάφρασης της τρεχαλάσης. Συνεπώς, σύμφωνα με αυτό το πρότυπο σύστημα, ο μηχανισμός των toehold switches με μάρτυρα ολόκληρο το γονίδιο της τρελαχάσης απαιτεί τουλάχιστον 69 λεπτά για να δώσει την τελική διάγνωση μέσω εμπορικού γλυκομέτρου.

Γ.4 Έλεγχος λειτουργικότητας των toehold switches

Προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα των toehold switches, χρειάζεται να εξετασθούν δύο ζητήματα. Το πρώτο είναι αν ο κάθε διακόπτης βρίσκεται στην κατάσταση ON απουσία του αντίστοιχου trigger RNA. Το δεύτερο είναι αν ο κάθε διακόπτης περνάει στην κατάσταση OFF παρουσία του αντίστοιχου trigger RNA. Σε ό,τι αφορά τα toehold switches με την TreA-a ως μάρτυρα, μία ακόμη παράμετρος είναι το αν θα επιτευχθεί η επανένωση του μορίου.

Για αυτό το σκοπό, έγινε επώαση του κάθε toehold switch στο σύστημα *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης για 3 ώρες, που θεωρείται το σημείο όπου η αντίδραση έχει φτάσει σε πλατώ, σύμφωνα με τον κατασκευαστή του κιτ. Κάθε toehold switch επώαστηκε με και χωρίς το αντίστοιχο trigger RNA του. Η αντίδραση επίσης πραγματοποιήθηκε και για την TreA-b/zipper-b, που μετά το πέρας της μεταγραφής – μετάφρασης προστέθηκε στις αντιδράσεις των toehold switches με την TreA-a ως μάρτυρα, αλλά και για την TreA (plasmid A), που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control της διαδικασίας. Ακολούθησε η αντίδραση ενζυμικής υδρόλυσης της τρεχαλόζης και εν τέλει η δυνητικά παραχθείσα γλυκόζη προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου του DNS.

Εν τέλει, διαπιστώθηκε παραγωγή γλυκόζης μόνο για το θετικό control (TreA). Αυτό σημαίνει πως τα toehold switches που ελέγχθηκαν *in vitro* όντως κατόρθωσαν να καταστείλουν την έκφραση του μάρτυρα, όχι ωστόσο επαγόμενα. Κάθε toehold switch που σχεδιάστηκε βρίσκεται σε κατάσταση ON, και παρουσία του αντίστοιχου trigger RNA δεν γίνεται εφικτή η μετάβασή του στην κατάσταση OFF.

Μέρος Δ

Συμπεράσματα

Δ.1 Τεχνικές κλωνοποίησης

Οι τεχνικές κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του συστήματος είναι η συμβατική ένωση τμημάτων DNA (DNA ligation), το Gibson Assembly και το Restriction Free Cloning. Το DNA ligation, παρά την αποτελεσματικότητά του για τις απαιτήσεις της κλωνοποίησης ενός ενθέματος προς πρωτεϊνική έκφραση, φάνηκε να μειονεκτεί ξεκάθαρα σε σχέση με τις άλλες δύο μεθόδους σε ό,τι αφορά τις χρονικές απαιτήσεις της διαδικασίας και την πολυπλοκότητα. Επίσης, δε μπορεί να ανταπεξέλθει σε απαιτήσεις κλωνοποίησης χωρίς “ουλές”, ή περισσότερων του ενός ενθεμάτων σε ένα στάδιο.

Το Gibson Assembly εν προκειμένω χρησιμοποιήθηκε για την ένωση δύο και τριών τμημάτων DNA (συμπεριλαμβανομένου του φορέα κλωνοποίησης), επιτυχώς. Ένα σημαντικό σημείο στη διαδικασία φάνηκε πως είναι ο σχεδιασμός των επικαλύψεων μεταξύ των τμημάτων, καθώς ανεπαρκείς επικαλύψεις έχουν ως αποτέλεσμα την ασθενή ένωση των τμημάτων και την αποσύνθεση του επιθυμητού πλασμιδίου ή διαγραφές τμημάτων του. Επίσης, ένας προβληματισμός για τη μέθοδο είναι ότι ήταν ανεπιτυχής για την κλωνοποίηση των trigger RNAs, παρά τις μεγάλες επικαλύψεις τους με το φορέα κλωνοποίησης. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι το τμήμα dsDNA που περιείχε τα trigger RNAs είχε μήκος μόλις 126 βάσεων, και η δράση της 5' εξωνουκλεάσης είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη διάσπασή του, ή έστω ενός επαρκώς μεγάλου τμήματός του ώστε να καθίσταται αδύνατη η διεκπεραίωση του Gibson Assembly. Γενικώς το Gibson Assembly συνίσταται για κλωνοποίηση τμημάτων DNA με μήκος μεγαλύτερο των 200 βάσεων [57].

Το Restriction Free Cloning επιτρέπει την κλωνοποίηση μόνο ενός ενθέματος, χωρίς “ουλές”. Με βάση τα αποτελέσματα της εργασίας, συγκριτικά με τις δύο άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, φάνηκε να είναι η αποτελεσματικότερη για τέτοιου είδους κλωνοποίηση. Χαρακτηριστικά, για την κλωνοποίηση και των τεσσάρων trigger RNAs ελέγχθηκαν συνολικά 17 αποικίες ως προς τη λήψη του σωστού ενθέματος και μόλις δύο εξ αυτών ήταν αρνητικές. Επίσης, αποτελεί την πιο εύκολη και γρήγορη μέθοδο ως προς το σχεδιασμό και την εκτέλεση.

Δ.2 Μηχανισμός των toehold switches

Στην εργασία αυτή σχεδιάστηκαν toehold switches για την ανίχνευση του ιού MERS-CoV και ελέγχθηκε *in vitro* η λειτουργικότητα των τεσσάρων πιο δόκιμων εξ αυτών. Όπως αναλύεται παραπάνω, τα toehold switches που ελέγχθηκαν κατόρθωσαν να βρεθούν στην κατάσταση ON, της κλειστής φουρκέτας που καταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης-μάρτυρα. Ωστόσο, παρουσία των αντίστοιχων trigger RNAs δεν κατόρθωσαν να περάσουν στην κατάσταση OFF, επάγοντας την έκφραση της πρωτεΐνης.

Με βάση τη δουλειά άλλων ερευνητικών ομάδων (iGEM Berlin 2017 [58], iGEM EPFL 2017 [40], iGEM Hong Kong CUHK [59]) που έχουν ασχοληθεί με την ανάπτυξη toehold switches για άλλους στόχους, η εύρεση ενός λειτουργικού toehold switch αποτελεί ουσιαστικά μία τυχαία διαδικασία διαλογής και απαιτεί τον έλεγχο δεκάδων ζευγών toehold switch – trigger RNA, ενώ εν προκειμένω ελέγχθηκαν μόλις τέσσερα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι τα ζεύγη που ελέγχονται *in vitro* επιλέγονται μέσω προσεγγιστικών θερμοδυναμικών μελετών που βασίζονται στη δισδιάστατη δομή των μορίων, που απέχει κατά πολύ από την πραγματική τους δομή στο χώρο. Συνεπώς, ένα πρώτο βήμα για τη συνέχεια της προκειμένης έρευνας είναι ο έλεγχος της λειτουργικότητας ενός σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού ζευγών toehold switch – trigger RNA.

Το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής της διαγνωστικής μεθόδου ωστόσο είναι η ευκολία τροποποίησής της, ως προς τον στόχο ανίχνευσης. Κάθε toehold switch ανιχνεύει ένα συγκεκριμένο trigger RNA ανάλογα με τις 30 βάσεις του toehold domain του. Συνεπώς, είναι εύκολο να σχεδιαστούν toehold switches πρακτικά για οποιονδήποτε στόχο, μεταβάλλοντας μόνο αυτές τις 30 βάσεις στη δομή της φουρκέτας. Αυτό δηλώνει τη δυναμικότητα και τη χρησιμότητα του μηχανισμού, καθώς επιτρέπει τη γρήγορη και άρα έγκαιρη ανάπτυξη μεθόδων για ανίχνευση αναδυόμενων παθογόνων και άλλων στόχων.

Δ.3 Η τρεχαλάση ως πρωτεΐνη-μάρτυρας στο μηχανισμό toehold switch

Η πρόταση της τρεχαλάσης ως μάρτυρας του συστήματος αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη αλλαγή στο μηχανισμό. Λόγω του μικρότερου μήκους της συγκριτικά με το συμβατικό μάρτυρα, β-γαλακτοζιδάση, αναμένεται να μειώσει σημαντικά τη στερεοχημική παρεμπόδιση για την προσέγγιση του toehold domain από το trigger RNA, άρα και τον απαιτούμενο χρόνο διάγνωσης. Σαφώς ωστόσο, ένα επόμενο στάδιο στην ανάπτυξη του συστήματος είναι η επιβεβαίωση της επανένωσης των δύο κλασμάτων της τρεχαλάσης, προκειμένου να ελεγχθεί αν πράγματι αυτή η εναλλακτική μειώνει περαιτέρω το χρόνο διάγνωσης.

Δ.4 Λήψη διάγνωσης μέσω εμπορικού γλυκομέτρου

Ο συνδυασμός της τεχνολογίας των toehold switches με το εμπορικό γλυκόμετρο αποτελεί ακόμη ένα σημείο βελτίωσης του μηχανισμού. Το σήμα που λαμβάνεται μέσω της β-γαλακτοζιδάσης είναι μία χρωματική αλλαγή που εξαρτάται συχνά από υποκειμενική ανάγνωση. Το γλυκόμετρο δίνει ένα αριθμητικό σήμα που επιτρέπει τη δυαδική διάγνωση, χωρίς περιθώρια υποκειμενικότητας, ενώ επίσης αποτελεί ένα έμπιστο όργανο που χρησιμοποιείται επί δεκαετίες. Κάτι που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μειονέκτημά του είναι το γεγονός πως το κατώτατο όριο ανίχνευσής του είναι ελαφρώς υψηλότερο από αυτό που θα απαιτούσε μία οπτική μέθοδος αλλαγής χρώματος (όπως επιβεβαιώθηκε και από το DNS). Ωστόσο αυτό ουσιαστικά είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη μέθοδο, καθώς προσφέρει μεγαλύτερη βεβαιότητα στην τελική διάγνωση. Η υπέρβαση ενός υψηλότερου ορίου συγκέντρωσης γλυκόζης σημαίνει με μεγαλύτερη σιγουριά έναν ενεργοποιημένο διακόπτη και συνεπώς μία δυσκολότερα αμφισβητούμενη διάγνωση, αποφεύγοντας την πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος.

Βιβλιογραφία

- [1] HISTORY. (2019). *First airplane flies*. Διαθέσιμο: <https://www.history.com/this-day-in-history/first-airplane-flies> [Πρόσβαση 14 Ιουνίου 2019].
- [2] World Tourism Organization UNWTO. (2019). *International Tourist Arrivals Reach 1.4 billion Two Years Ahead of Forecasts*. Διαθέσιμο: <http://www2.unwto.org/press-release/2019-01-21/international-tourist-arrivals-reach-14-billion-two-years-ahead-forecasts> [Πρόσβαση 14 Ιουνίου 2019].
- [3] Steffen, R., De Bernardis, C. & Banos, A. (2003). Travel epidemiology-a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, pp. 89-95.
- [4] ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (2007). *Εγχειρίδιο Ταξιδιωτικής Ιατρικής*. pp. 15-16
- [5] Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. (2015). *WHO publishes list of top emerging diseases likely to cause major epidemics*. Διαθέσιμο: <https://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/> [Πρόσβαση 15 Ιουνίου 2019].
- [6] Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. (2019). *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. Διαθέσιμο: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/> [Πρόσβαση: 28 Μαΐου 2019].
- [7] Burrell, C., Howard, C. & Murphy, F. (2017). *Fenner and White's Medical Virology – Chapter 31: Coronaviruses*. 5th ed. pp.437-446.
- [8] Reusken, C., Farag, E., Jonges, M., Godeke, G., El-Sayed, A., Pas, S., Raj, V., Mohran, K., Moussa, H., Ghobashy, H., Alhajri, F., Ibrahim, A., Bosch, B., Pasha, S., Al-Romaihi, H., Al-Thani, M., Al-Marri, S., AlHajri, M., Haagmans, B. & Koopmans, M. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Eurosurveillance*, 19(23).
- [9] Firth, A. & Brierley, I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 93(7), pp.1385-1409.
- [10] Kilianski, A., Mielech, A., Deng, X. & Baker, S. (2013). Assessing Activity and Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Papain-Like and 3C-Like Proteases Using Luciferase-Based Biosensors. *Journal of Virology*, 87(21), pp.11955-11962.
- [11] Coleman, C. & Frieman, M. (2014). Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *Journal of Virology*, 88(10), pp.5209-5212.

- [12] Baez-Santos, Y., Mielech, A., Deng, X., Baker, S. & Mesecar, A. (2014). Catalytic Function and Substrate Specificity of the Papain-Like Protease Domain of nsp3 from the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Virology*, 88(21), pp.12511-12527.
- [13] Chu, H., Zhou, J., Ho-Yin Wong, B., Li, C., Cheng, Z., Lin, X., Kwok-Man Poon, V., Sun, T., Choi-Yi Lau, C., Fuk-Woo Chan, J., Kai-Wang To, K., Chan, K., Lu, L., Zheng, B. & Yuen, K. (2014). Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. *Virology*, 454-455, pp.197-205.
- [14] Drosten, C., Seilmaier, M., Corman, V., Hartmann, W., Scheible, G., Sack, S., Guggemos, W., Kallies, R., Muth, D., Junglen, S., Müller, M., Haas, W., Guberina, H., Röhnisch, T., Schmid-Wendtner, M., Aldabbagh, S., Dittmer, U., Gold, H., Graf, P., Bonin, F., Rambaut, A. & Wendtner, C. (2013). Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(9), pp.745-751.
- [15] Wang, F. & Zhang, W. (2019). Synthetic biology: Recent progress, biosafety and biosecurity concerns, and possible solutions. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 1(1), pp.22-30.
- [16] Gardner, T., Cantor, C. & Collins, J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403(6767), pp.339-342.
- [17] Elowitz, M. and Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403(6767), pp.335-338.
- [18] iGEM. (2019). *Registry Of Standard Biological Parts*. Διαθέσιμο: http://parts.igem.org/Main_Page [Πρόσβαση: 4 Jun. 2019].
- [19] OpenWetWare. (2019). *OpenWetWare*. Διαθέσιμο: https://openwetware.org/wiki/Main_Page [Πρόσβαση: 4 Jun. 2019].
- [20] Moon, T., Lou, C., Tamsir, A., Stanton, B. & Voigt, C. (2012). Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. *Nature*, 491(7423), pp.249-253.
- [21] Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F. & Marraffini, L. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, 41(15), pp.7429-7437.
- [22] Khalil, A. & Collins, J. (2010). Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), pp.367-379.
- [23] Kuldell, N., Bernstein, R., Ingram, K. & Hart, K. (2015). *BioBuilder*. 1st ed. O'Reilly.
- [24] Isaacs, F., Dwyer, D., Ding, C., Pervouchine, D., Cantor, C. & Collins, J. (2004). Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nature Biotechnology*, 22(7), pp.841-847.
- [25] Myhrvold, C. & Silver, P. (2015). Using synthetic RNAs as scaffolds and regulators. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), pp.8-10.

- [26] Geraldi, A. & Giri-Rachman, E. (2018). Synthetic biology-based portable in vitro diagnostic platforms. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), pp.423-428.
- [27] Clark, D. & Pazdernik, N. (2013). *Molecular biology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier.
- [28] Wittmann, A. & Suess, B. (2012). Engineered riboswitches: Expanding researchers' toolbox with synthetic RNA regulators. *FEBS Letters*, 586(15), pp.2076-2083.
- [29] Ellington, A. & Szostak, J. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), pp.818-822.
- [30] Green, A., Silver, P., Collins, J. & Yin, P. (2014). Toehold Switches: De-Novo-Designed Regulators of Gene Expression. *Cell*, 159(4), pp.925-939.
- [31] Pardee, K., Green, A., Ferrante, T., Cameron, D., DaleyKeyser, A., Yin, P. & Collins, J. (2014). Paper-Based Synthetic Gene Networks. *Cell*, 159(4), pp.940-954.
- [32] Pardee, K., Green, A., Takahashi, M., Braff, D., Lambert, G., Lee, J., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N., Bosch, I., Dudley, D., O'Connor, D., Gehrke, L. & Collins, J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), pp.1255-1266.
- [33] Lopatkin, A. & You, L. (2014). Synthetic Biology Looks Good on Paper. *Cell*, 159(4), pp.718-720.
- [34] Soltani, M., Davis, B. R., Ford, H., Nelson, J. A. D., & Bundy, B. C. (2018). Reengineering cell-free protein synthesis as a biosensor: Biosensing with transcription, translation, and protein-folding. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 165–171.
- [35] Pellinen, T., Huovinen, T. & Karp, M. (2004). A cell-free biosensor for the detection of transcriptional inducers using firefly luciferase as a reporter. *Analytical Biochemistry*, 330(1), pp.52-57.
- [36] iGEM Athens 2018. (2018). *Team Athens - Design*. Διαθέσιμο: <http://2018.igem.org/Team:Athens/Design> [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].
- [37] UniProt. (2019). *GFP - Green fluorescent protein - Aequorea victoria (Jellyfish) - GFP gene & protein*. Διαθέσιμο: <https://www.uniprot.org/uniprot/P42212> [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].
- [38] UniProt. (2019). *luc - Firefly luciferase - Photinus pyralis (Common eastern firefly) - luc gene & protein*. Διαθέσιμο: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q27758> [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].
- [39] UniProt. (2019). *lacZ - Beta-galactosidase - Escherichia coli (strain K12) - lacZ gene & protein*. Διαθέσιμο: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00722> [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].
- [40] iGEM EPFL 2017. (2017). *Team EPFL – Toehold – Description*. Διαθέσιμο: <http://2017.igem.org/Team:EPFL/Description/Toehold> [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].
- [41] Miller, F. & Hershberger, C. (1984). A quantitative β -galactosidase a-complementation assay for fusion proteins containing human insulin B-chain peptides. *Gene*, 29(1-2), pp.247-250.

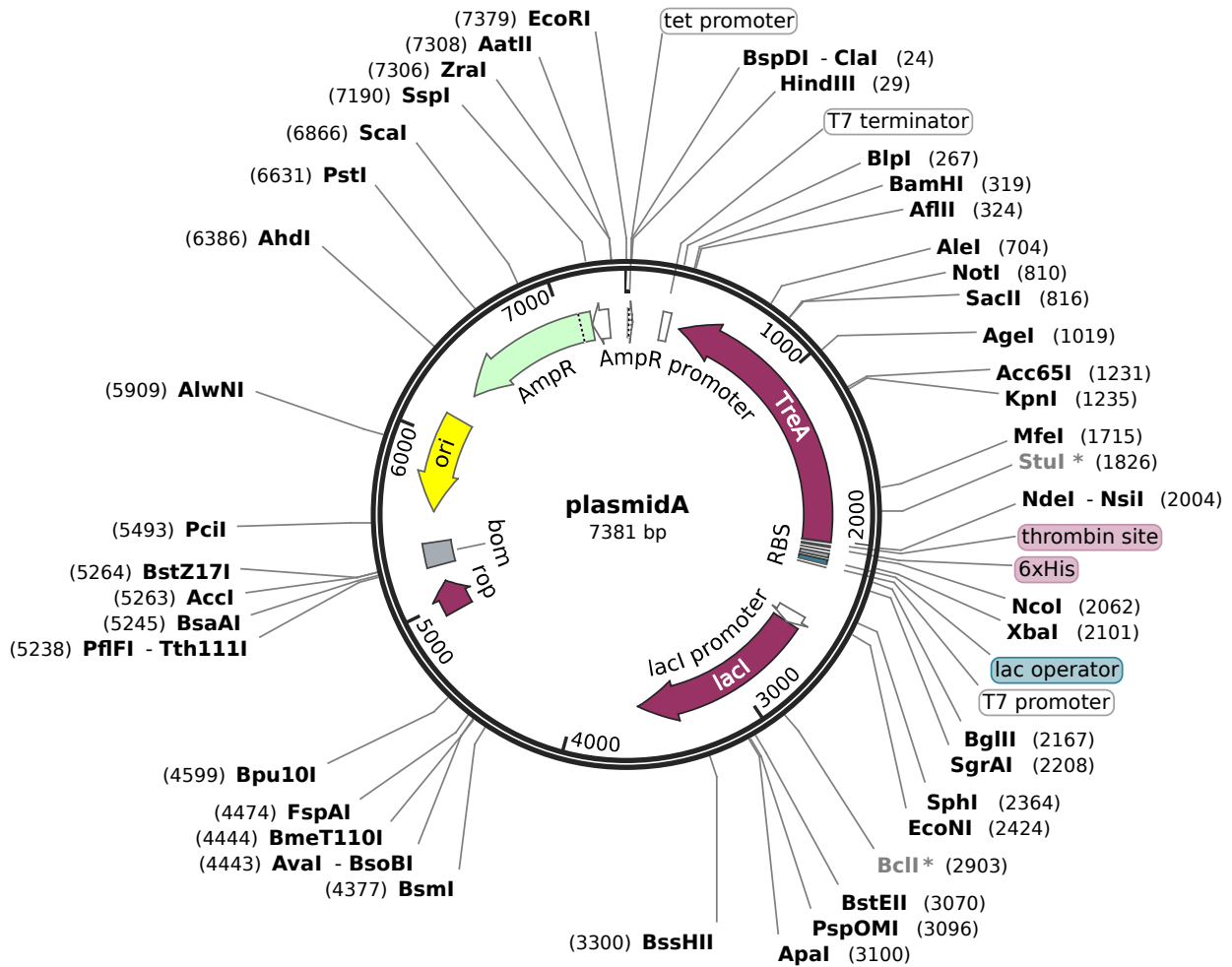
- [42] Ma, D., Shen, L., Wu, K., Diehnelt, C. & Green, A. (2018). Low-cost detection of norovirus using paper-based cell-free systems and synbody-based viral enrichment. *Synthetic Biology*, 3(1).
- [43] Drikkic, M. & De Buck, J. (2018). Split trehalase as a versatile reporter for a wide range of biological analytes. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), pp.1128-1136.
- [44] Aronsson, C., Dånmark, S., Zhou, F., Öberg, P., Enander, K., Su, H. & Aili, D. (2015). Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties. *Scientific Reports*, 5(1).
- [45] J.S.H. (1921). Dinitrosalicylic acid—a reagent for glucose. *Journal of the Franklin Institute*, 192(2), p.248.
- [46] Morell-Garcia, D., Bauça, J., Barceló, A., Perez-Esteban, G. & Vila, M. (2014). Usefulness of Benedict's test for the screening of galactosemia. *Clinical Biochemistry*, 47(9), pp.857-859.
- [47] Walther, W. & Stein, U. (2009). *Gene Therapy of Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press.
- [48] Lodish, H. & Darnell, J. (2002). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman.
- [49] Svein, V. & Lale, R. (2014). *DNA Cloning and Assembly Methods*, Methods in Molecular Biology, vol. 1116, Springer, New York
- [50] Gibson, D., Young, L., Chuang, R., Venter, J., Hutchison, C. & Smith, H. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), pp.343-345.
- [51] Verity, E., Camuglia, S., Agius, C., Ong, C., Shaw, R., Barr, I., Middleton, D. & Rockman, S. (2011). Rapid generation of pandemic influenza virus vaccine candidate strains using synthetic DNA. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(2), pp.101-109.
- [52] Birla, B. & Chou, H. (2015). Rational Design of High-Number dsDNA Fragments Based on Thermodynamics for the Construction of Full-Length Genes in a Single Reaction. *PLOS ONE*, 10(12), pp.145-162.
- [53] Chen, G.J., Qiu, N., Karrer, C., Caspers, P. & Page, M.G. (2000). Restriction site-free insertion of PCR products directionally into vectors. *Biotechniques*, 28, pp.498–500.
- [54] Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. & Peleg, Y. (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology*, 172(1), pp.34-44.
- [55] NEBuilder® Assembly Tool (New England Biolabs). Διαθέσιμο: nebuilder.neb.com
- [56] SnapGene® (GSL Biotech). Διαθέσιμο: snapgene.com
- [57] Kostylev, M., Otwell, A., Richardson, R. & Suzuki, Y. (2015). Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5α-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLOS ONE*, 10(9), p.e0137466.

[58] iGEM Berlin 2017. (2017). *Team Berlin – diagnost-x*. Διαθέσιμο: http://2017.igem.org/Team:Berlin_diagnostX [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].

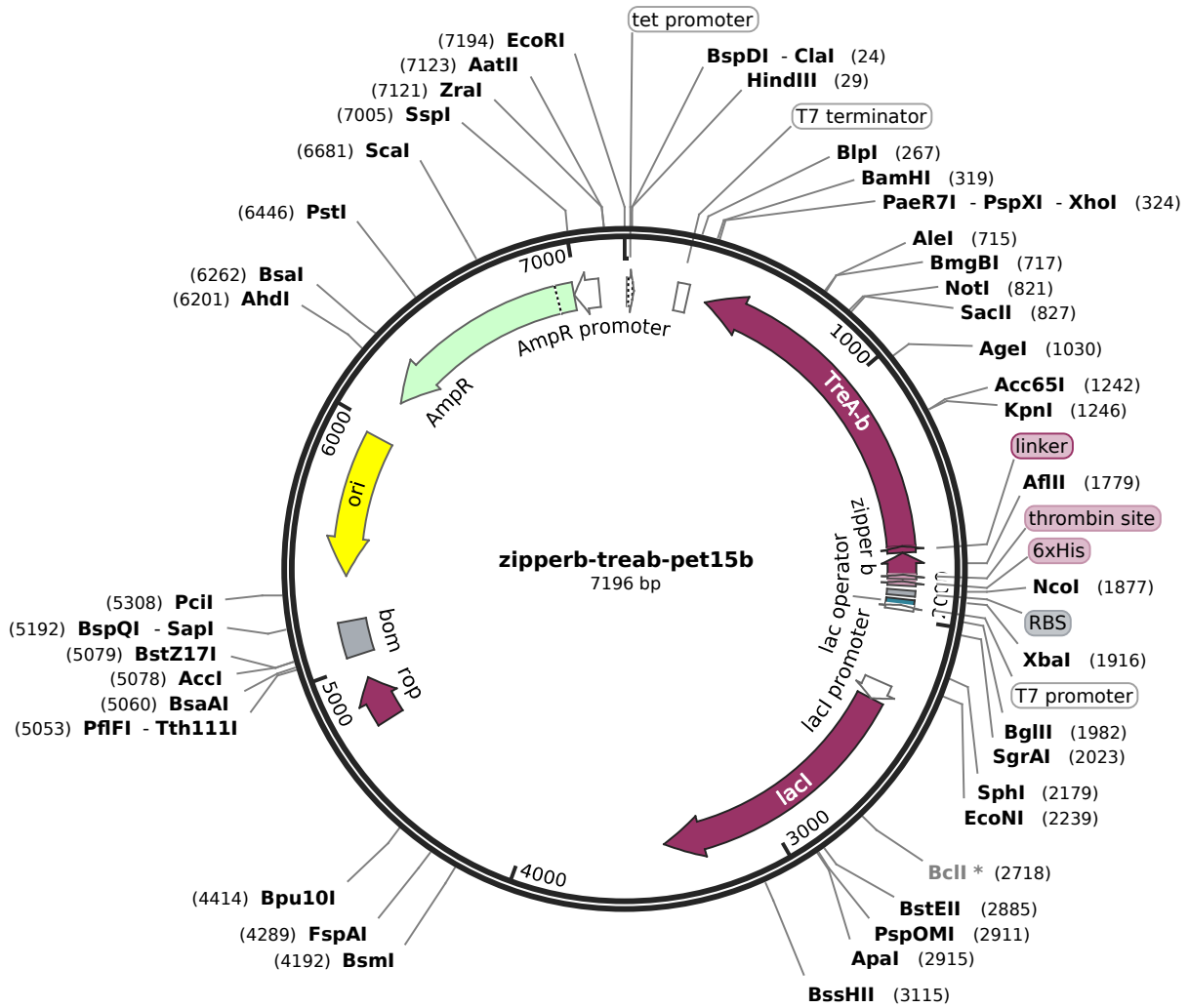
[59] iGEM Hong Kong CUHK 2017. (2017). *Team Hong Kong CUHK – DR SWITCH*. Διαθέσιμο: http://2017.igem.org/Team:Hong_Kong-CUHK [Πρόσβαση 19 Ιουνίου 2019].

Παράρτημα I

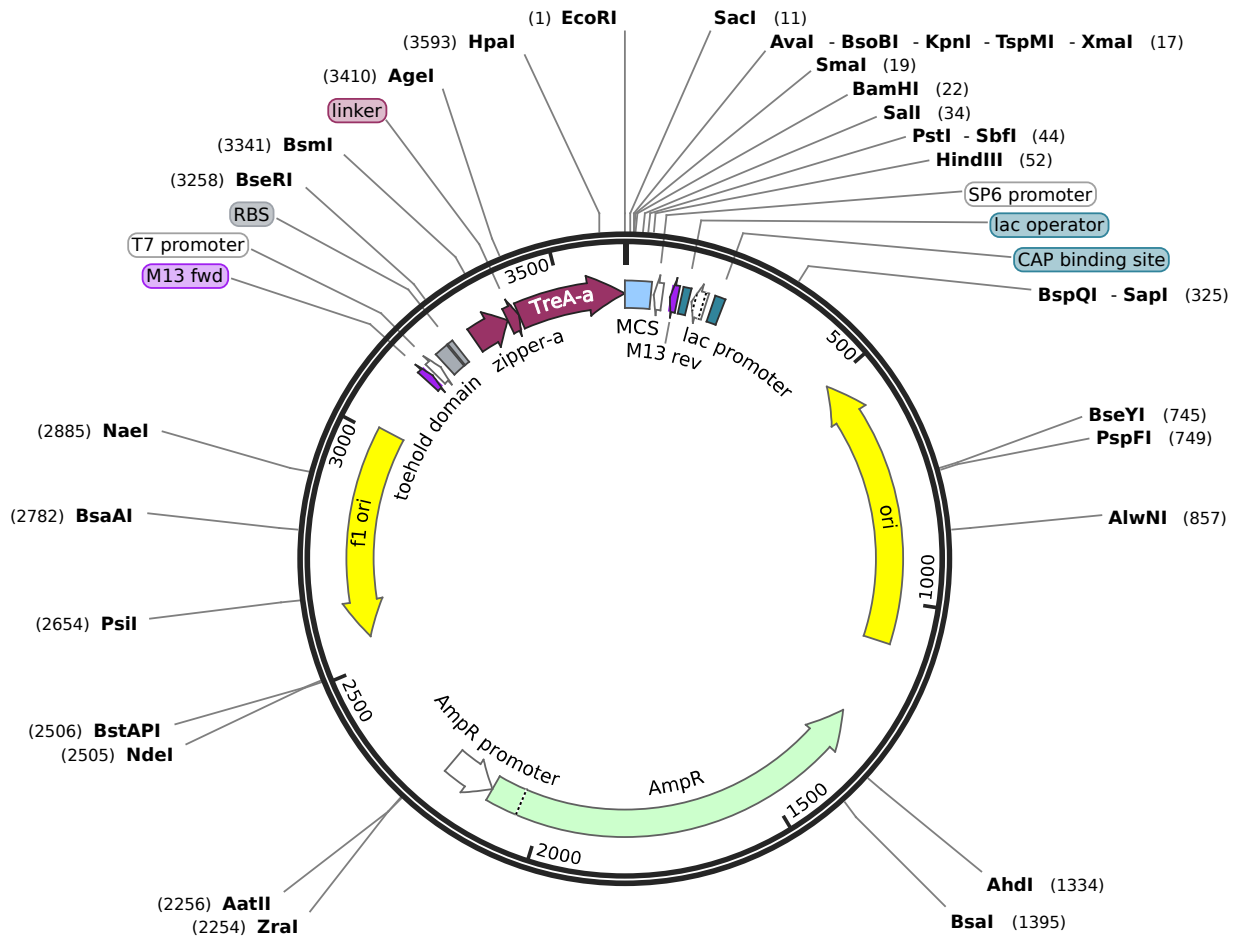
Χάρτες Πλασμιδίων



ΕΙΚΟΝΑ Π.Ι.1. Ένθεμα: TreA
Φορέας κλωνοποίησης: pET-15b

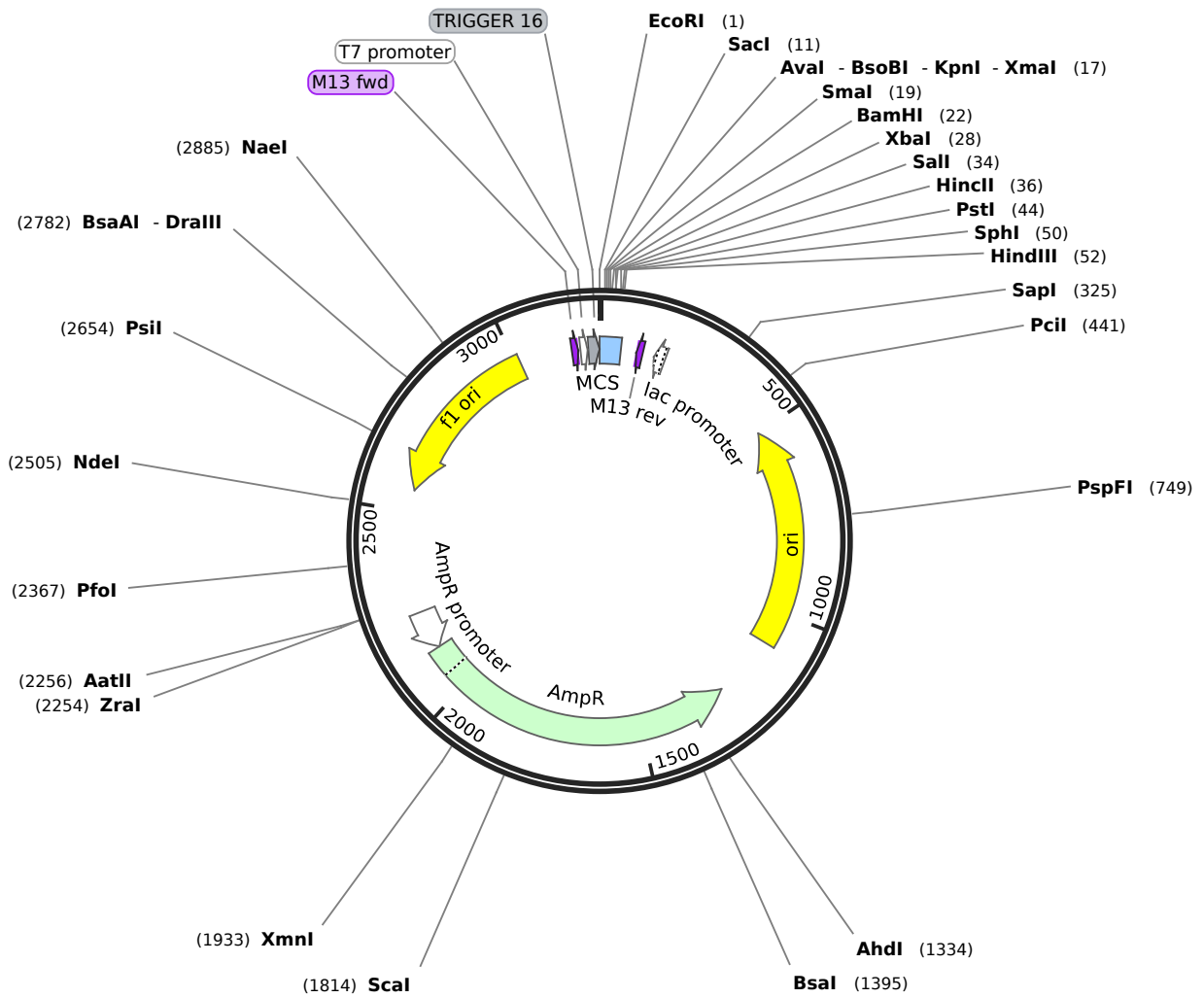


ΕΙΚΟΝΑ Π.Ι.2. Ένθεμα: zipper-b / TreA-b
Φορέας κλωνοποίησης: pET-15b



Toehold Switch 3 3638bp ds-DNA circular SYN 16-JAN-2019
3638 bp

ΕΙΚΟΝΑ Π.Ι.3. Ένθεμα: Toehold switch με TreA-a
Φορέας κλωνοποίησης: pGEM-3Zf(+)



Trigger 16 3227bp ds-DNA circular SYN 16-JAN-2019
3227 bp

ΕΙΚΟΝΑ Π.Ι.5. Ένθεμα: Trigger RNA
Φορέας κλωνοποίησης: pGEM-3Zf(+)

Παράρτημα ΙΙ

Γονιδιακές Ακολουθίες

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙ.1: Toehold switches που ελέγχθηκαν *in vitro*.

Toehold Switch	Ακολουθία
3	AACACAAACGATTGCCGCGATCTTGTTACTATAAAAAGAGGAGAAAATATAGTAT GAAGATCGCGAACCTGGCGGCAGCGCAAAAAG
7	ATTCTTTGGGTCAAGTTTAAATGGCTCCACTTATAAAGAGGAGAAAATAAGTAT GGCCATTA AAAACCTGGCGGCAGCGCAAAAAG
8	ATAGA A C T T T G T A G T A C C A A T G A C G C A A G T A T A A A A G A G G A G A A A T A T A C T A T G T C A T T G G T A A C C T G G C G G C A G C G C A A A A A G
16	A C C A T A G A A C T T T G T A G T A C C A A T G A C G C A A T A A A A G A G G A G A A A T A T T G C A T G A T T G G T A C T A A C C T G G C G G C A G C G C A A A A A G

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙ.2: Trigger RNAs για τα αντίστοιχα toehold switches που ελέγχθηκαν *in vitro*.

Trigger RNA	Ακολουθία
3	AGTAACAAGATCGCGGCAATCGTTTTGTGTT
7	AGTGGAGCCATTAAACTTGACCCAAAAGAAT
8	ACTTGCGTCATTGGTACTACAAAGTTCTAT
16	TGCGTCATTGGTACTACAAAGTTCTATGGT

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙ.3: Ακολουθίες των φερμουάρ λευκίνης.

Δομή	Ακολουθία
zipper-a	GAGATAGCTGCGCTCGAAAAAGAGATAGCGGCTCTGGAGAAAGAGAATGCCGC GCTAGAGTGGGAAATAGCGGCACTAGAGAAA
zipper-b	AAAATTGCGGCGCTGAAAGAAAAGATCGCAGCGCTTAAGGAGAAAAACGCGGC GCTGAAATGGAAAATAGCTGCGCTAAAGGAA
σύνδεσμος	GGAGGTAGTGGCGGAAGTGGTGGAAAGT

Παράρτημα III

Εκκινητές

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.1: Εκκινητές για την απομόνωση της TreA προς κλωνοποίησή της μέσω των ενζύμων BamHI και NdeI.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
TreAF	CAGCCATATGAAGAAACACCGGTAACACCACA	32	72°C
TreAR	CGCGGATCCTTAAGGTGTGGGTTGTGCCTCT	31	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.2: Εκκινητές για την απομόνωση της TreA-a.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
TreA-aF	AAGAAACACCGGTAACACCACA	22	64°C
TreA-aR	TTACGGAACATATTTCTCGCCTTC	24	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.3: Εκκινητές για την απομόνωση της TreA-b.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
TreA-bF	CCAGAGGGGCAGTCACTGCGCGA	23	67°C
TreA-bR	TTAAGGTGTGGGTTGTGCCTCT	22	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.4: Εκκινητές για τη γραμμικοποίηση του φορέα pGEM-3Zf(+) και την επέκταση των άκρων του προς Gibson Assembly των toehold switches με TreA-a.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
pGEM-Zf(+)F	GAATTCGAGCTCGGTACC	18	61°C
pGEM-Zf(+)R	ATCGCGGCAATCGTTTGTGTTCCCTCTAGAGCCCTA TAGTGAGTCGTATTAC	52	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.5: Εκκινητές για την επέκταση των άκρων της TreA-a προς Gibson Assembly των toehold switches με TreA-a.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
TreAa_F	AAAGGAGGTAGTGGCGGAAGTGGTGGGAAGTGAAGAA ACACCGGTAACAC	49	72°C
TreAa_R	AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCGGAAC ATATTTCTCGCC	48	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.6: Εκκινητές για τη γραμμικοποίηση του φορέα με διαγραφή της ακολουθίας του zipper-a και της TreA-a προς Gibson Assembly των toehold switches με TreA.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
pGEM_TS_F	GAATTCGAGCTCGGTACCCG	20	65°C
pGEM_TS_R	CTTTTGCCTGCCGCCAG	18	

ΠΙΝΑΚΑΣ Π.ΙΙΙ.7: Εκκινητές για την επέκταση των άκρων της TreA προς Gibson Assembly των toehold switches με TreA.

Εκκινητής	Ακολουθία	Μήκος	T _m
TreA_F	ATTGGTACTAACCTGGCGGCAGCGCAAAAGGAAGA AACACCGGTAACAC	49	72°C
TreA_R	AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTTAAG GTGTGGTTGTGC	48	

Παράρτημα IV

Πίνακας Συντμήσεων

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome - Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας
ATP	Adenosine Triphosphate - Τριφωσφορική Αδενοσίνη
bp	base pairs - ζεύγη βάσεων
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ddH₂O	double distilled H ₂ O - δις απεσταγμένο H ₂ O
DNA	Deoxyribonucleic Acid - Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
DNS	Dinitrosalicylic Acid - Δινιτροσαλικυλικό Οξύ
ds	double stranded - δίκλωνο
GFP	Green Fluorescent Protein - Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη
GTP	Guanosine Triphosphate - Τριφωσφορική Γουανοσίνη
iGEM	International Genetically Engineered Machine
LB	Luria Bertani
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
mRNA	messenger RNA - αγγελιοφόρο RNA
NSP	Non Structural Protein - Μη Δομική Πρωτεΐνη
ORF	Open Reading Frame - Ανοικτό Πλαίσιο Ανάγνωσης
PCR	Polymerase Chain Reaction - Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
RBS	Ribosome Binding Site - Θέση Πρόσδεσης Ριβοσώματος
RFC	Restriction Free Cloning
RNA	Ribonucleic Acid - Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RT	Room Temperature - Θερμοκρασία Περιβάλλοντος
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction- Αντίστροφης Μεταγραφής Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SD	Shine-Dalgarno
ss	single stranded - μονόκλωνο
tRNA	transfer RNA - μεταφορικό RNA
USD	United States Dollar - Δολάριο ΗΠΑ

