

# Slovenski uspeh na tekmovanju iz biomolekularnega dizajna BIOMOD 2011

Jernej Turnšek

Nanotehnologija zajema raziskovanje in načrtovanje snovi na atomski in molekularni ravni. V splošnem se ukvarja z razvojem materialov in naprav, ki v vsaj eno razsežnost merijo od enega do sto nanometrov. Za lažjo predstavo: to je nekaj tisočkrat manj kot znaša debelina povprečnega človeškega lasu. Ali povedano drugače: v času, ki ga moški porabi, da dvigne britvico k bradi, ta zraste za en nanometer. Nanotehnologija sodi med najbolj perspektivne in hitro razvijajoče se gospodarske panoge. Zaradi številnih vlaganj največjih svetovnih gospodarstev v njen razvoj si lahko obetamo veliko novih aplikacij v medicini, tekstilni, kozmetični in živilski industriji, na področjih energetike ter okoljskih, informacijskih in komunikacijskih tehnologij.

## Bionanotehnologija

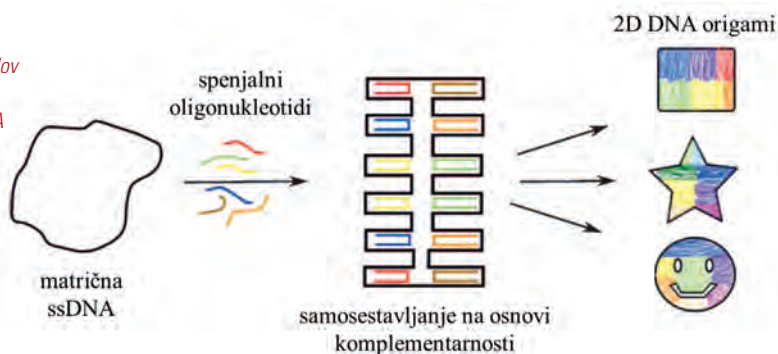
Kot že predpona v imenu nakazuje, se v bionanotehnologiji v proces načrtovanja nanostruktur vključujejo biološke molekule, kot je na primer DNA. Komplementarnost njenih osnovnih gradnikov, nukleotidov

(adenin se pari s timinom, gvanin pa s citozinom), lahko izkoristimo za pripravo najrazličnejših dvo- ali trirazsežnih nanostruktur. Ta veja bionanotehnologije se imenuje DNA-nanotehnologija in temelji na načelu samosestavljanja enoverižne molekule DNA v dvojne vijajnice na osnovi komplementarnih zaporedij.

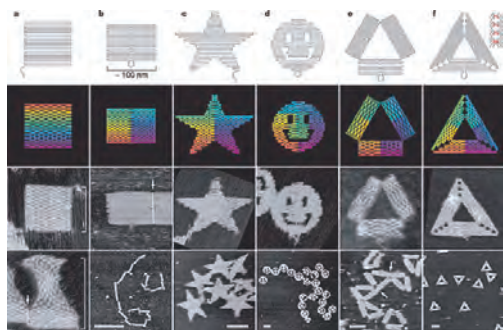
## Kratka zgodovina razvoja DNA-nanotehnologije

Pionirski koraki na tem področju so plod dela ameriškega nanotehnologa in kristalografa Neda Seemana iz osemdesetih let dvajsetega stoletja. Že jeseni leta 1980 je med opazovanjem Escherjevega lesoreza *Globina* prišel na idejo, da bi lahko trirazsežne DNA-strukture uporabili kot ogrodje za orientacijo molekul, kar bi olajšalo njihove kristalografske študije. V letih po tej prvi omembi uporabe molekule DNA onkraj nosilke genetske informacije so bile razvite številne metode za načrtovanje dvo- ali trirazsežnih DNA-nanostruktur. O pravem razcvetu DNA-nanotehnologije pa začne-

*Tehnika DNA-origami.  
Približno 200 kratkih  
spenjalnih oligonukleotidov  
je potrebnih za zvitje  
enoverižne matrične DNA  
v določeno strukturo.  
Iz članka A. Samoze, 2009.*



mo govoriti šele z letom 2006, ko je Paul Rothemund, računalničar iz Kalifornijskega tehnološkega inštituta (Caltech), predstavil tehniko DNA-origami. Analogno z japonsko umetnostjo prepogibanja papirja, pri tej tehniki kratki, tako imenovani spenjalni oligonukleotidi usmerjajo zvitje približno 7.000 nukleotidov dolge enoverižne virusne molekule DNA v poljubno dvo- ali trirazsežen objekt nanometrskih razsežnosti. Danes je njihovo načrtovanje podprto z računalniškimi orodji, kot sta caDNA in CanDo.



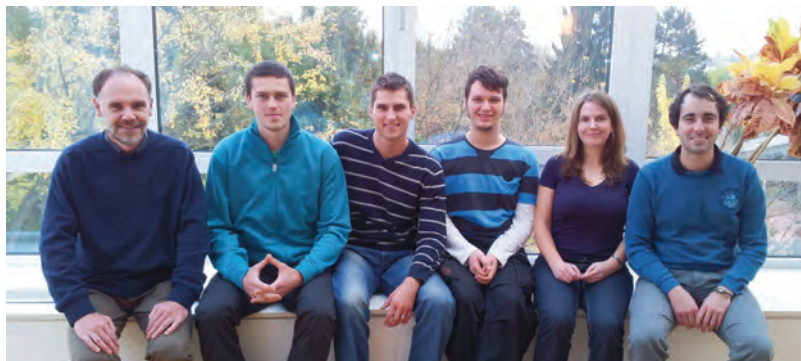
Primeri dvorazsežnega DNA-origamija. V zgornjih dveh vrsticah so prikazani računalniško generirani vzorci različnih dvorazsežnih oblik DNA-origamija, v spodnjih dveh pa njihove dejanske uresničitve. Slike so bile posnete z mikroskopom na atomsko silo (AFM).

Iz članka P. W. K. Rothemunda, 2006.

## BIOMOD – študentsko tekmovanje v biomolekularnem dizajnu

Novembra leta 2011 je na znameniti ameriški univerzi Harvard pod gostiteljstvom Inštituta Wyss za biološko navdahnjeni

inženiring (angleško *Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering*) potekalo 1. mednarodno študentsko tekmovanje v biomolekularnem dizajnu BIOMOD (angleško *BIOMolecular Design*). Inštitut Wyss je bil ustanovljen leta 2008 po 125 milijonov dolarjev »težki« donaciji švicarskega poslovnega Hansjörga Wyssa, kar je najvišji enkratni znesek, ki ga je Univerza Harvard prejela v svoji zgodovini. V njegovem okviru delujejo raziskovalci iz uglednih bostonskih ustanov, med drugim z Univerze Harvard, MIT in Univerze v Bostonu. Kot je mogoče razbrati že iz polnega imena inštituta, je njegovo poslanstvo bioinženiring na podlagi zgledov iz narave. Med temeljne usmeritve inštituta sodita tudi sintezna biologija in DNA-nanotehnologija. Prvega tekmovanja BIOMOD se je udeležilo 21 študentskih skupin s celega sveta, med drugim nekatere z vodilnih univerz na področju DNA-nanotehnologije, kot so Harvard, MIT, Caltech in Tehniška univerza v Münchnu, ter več ekip iz Indije, Kitajske in Japonske. Sodelujoči slovenski projekt je bil zasnovan in izveden v prostorih Laboratorija za biotehnologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani. Ekipo so sestavljali prof. dr. Roman Jerala (mentor in vodja projekta), dr. Iva Hafner Bratkovič in Rok Gaber (mentorja) ter študentje Vid Kočar (študent biokemije na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani), Marko Verce in Jernej Turnšek (študenta biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani), ki so se v preteklih letih



Slovenska ekipa na tekmovanju BIOMOD 2011. Od leve proti desni: prof. dr. Roman Jerala, Jernej Turnšek, Vid Kočar, Marko Verce, dr. Iva Hafner Bratkovič in Rok Gaber.

že izkazali kot člani slovenskih ekip na širši javnosti bolj znanem mednarodnem študentskem tekmovanju iz sintezne biologije iGEM.

S projektom, ki je predstavil nov način funkcionalizacije nanostruktur na osnovi tehnike DNA-origami, je slovenska ekipa na tekmovanju dosegla lep uspeh. Osvojila je drugo mesto za spletno stran, zavihtela pa se je tudi na tretjo mesto za predstavitveni YouTube video in prejela zlato medaljo, ki je pripadla najboljšim projektom po mnenju strokovne komisije. Skupno zmago je slavila danska ekipa z univerze v Aarhusu, ki je pripravila RNA-oktaeder z možnostjo uporabe v medicini.

### Poroka proteinov in DNA – slovenski projekt na tekmovanju BIOMOD 2011

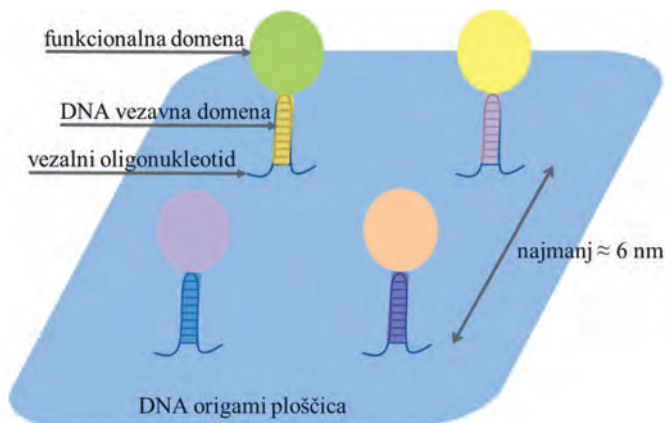
Nanostrukture na osnovi tehnike DNA-origami imajo same po sebi omejeno uporabnost, omogočajo pa vezavo kemijskih zvrsti na točno določena mesta. Skupina slovenskih študentov je pod mentorstvom raziskovalcev s Kemijskega inštituta v Ljubljani razvila novo tehnologijo za uvajanje proteinov z nanometrsko ločljivostjo v strukture, ki merijo nekaj deset nanometrov. V ta namen so s tehnologijo rekombinantne DNA pripravili fuzijske proteine med DNA-vezavnimi in različnimi funkcionalnimi domenami. Funkcionalizacija DNA-nanostruktur s proteini je precej logična izbira,

če pomislimo na številne funkcije, ki jih ti v naravi opravljajo (encimske, obrambne, strukturne, optične in druge). Pripravili so tudi 100 nanometrov dolgo in 70 nanometrov široko DNA-origami ploščico, kamor so se fuzijski proteini lahko vezali. Kot je razvidno iz slike na prejšnji strani, so za oblikovanje nanostruktur na osnovi tehnike DNA-origami potrebni kratki, spenjalni oligonukleotidi. Nekatere od teh lahko načrtujemo tako, da zavzamejo obliko zanke, ki štrli pravokotno iz ravnine DNA-origamija in vsebuje nukleotidno zaporedje za vezavo določene DNA-vezavne domene. Takšnim oligonukleotidom pravimo vezalni.

Razvoj omenjene tehnologije odpira vrata številnim naprednim uporabam, kot so biosenzorji, laboratoriji na nanočipu, biosintezni nanoreaktorji ali nanometrski elektronski elementi.

Poleg vezave proteinov na DNA-origami ploščico je raziskovalce s Kemijskega inštituta zanimalo tudi, ali bi se dalo več takšnih DNA-nanostruktur povezati v navpične sklade, kar bi lahko bila osnova nanometrskim elektronskim elementom. Uspešno so pokazali z oligonukleotidi posredovano zlaganje dveh DNA-origami ploščic v sklad. V vsako od njiju so bili vključeni spenjalni oligonukleotidi s kratkim enoverižnim DNA-repkom, ki je štrlel iz ravnine obeh ploščic. Zaradi komplementarnosti zaporedij

*Shematični prikaz osnovne ideje slovenskega projekta BIOMOD 2011. Vključitev vezalnih oligonukleotidov v dizajn DNA-origami ploščice narekuje vezavo fuzijske proteinov na točno določena mesta, ki so lahko najmanj 6 nanometrov narazen. V teoriji lahko na takšne nanostrukture pripnemo poljubno število različnih funkcionalnih domen.*



med DNA-repki v nasprotnih ploščicah sta se ti lahko povezali. Kot neke vrste molekularni ježek.

### Pogled v prihodnost

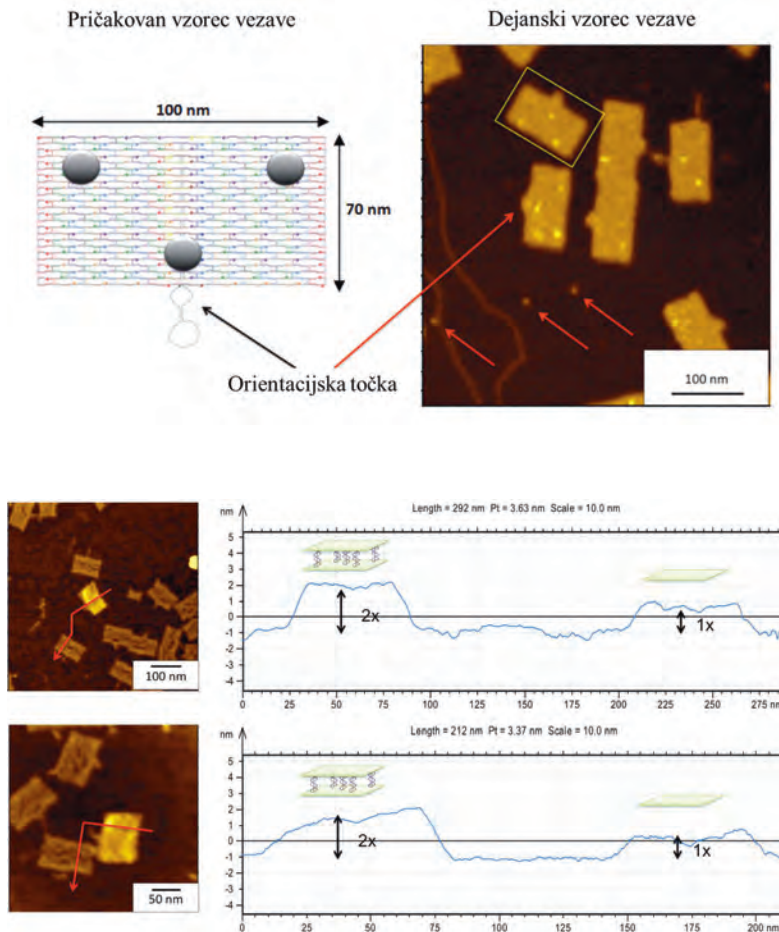
Vertikalno zlaganje DNA-origami ploščic bi bilo možno doseči tudi s pomočjo proteinov. V ta namen potrebujemo fuzijske proteine z dvema DNA-vezavnima domenama, od katerih se vsaka veže na svojo DNA-origami

ploščico. Študentje so pripravili dva takšna proteina, preizkus delovanja zamisli pa je stvar prihodnjih raziskav.

Ena izmed bolj zanimivih uporabnih plati vezave proteinov na DNA-nanostrukture je prostorsko usmerjeno razmeščanje biosinteznih encimov. V naravi je optimizacija številnih metabolnih procesov posledica organizacije encimov v multienziemske komplekse. Bližina encimov poveča hitrost reakcij, preprečuje ponor vmesnih produktov v

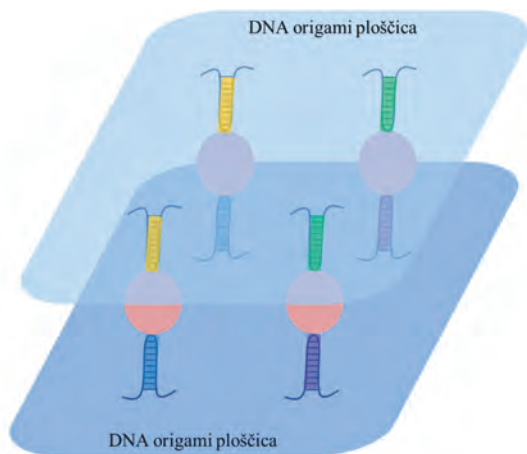
*Rezultat vezave fuzijskih proteinov na DNA-origami ploščico. Na levi je pričakovani vzorec vezave. Fotografija na desni je bila posneta z mikroskopom na atomsko silo. Z rumeno je ukvirjena DNA-origami ploščica s proteini (svetlo rumene pike), ki zasedajo vsa tri vezalna mesta. Kratke rdeče puščice kažejo na nevezane proteine, adsorbirane na nosilec.*

*Avtor: Vid Kočar.*

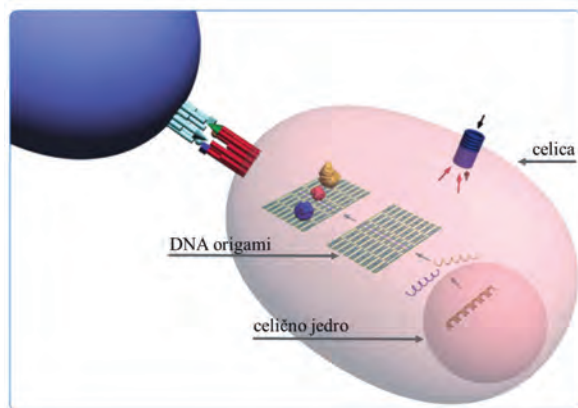


*Levo: Rdeče puščice kažejo na opravljeno pot z mikroskopom na atomsko silo za ekstrakcijo višinskega profila vzorca. Desno: Iz višinskega profila razberemo, da je sklad dveh DNA-origami ploščic dvakrat višji od posamezne.*

*Avtor: Vid Kočar.*



Vertikalni sklad DNA-origami ploščic na osnovi proteinov. Z modro, rumeno, zeleno in vijolično so označene različne DNA-vezavne domene, z rdečo pa proteinska domena za lažjo izolacijo proteinov, ki obenem služi tudi kot neke vrste distančnik, s katerim lahko uravnavamo razdaljo med DNA-origami ploščicama.



V celicah bi lahko na kompleksnih DNA-nanostrukturah prostorsko usmerjeno kopičili proteine (označeni z rumeno, rožnato in vijolično barvo) za študij celičnih procesov in načrtovanje bioloških sistemov z izboljšanimi ali celo povsem novimi lastnostmi.

Iz članka A. V. Pinheiro in sodelavcev, 2011.

stranskih reakcij in vodi v boljše izkoristke biosintezne poti. Sintetične trirazsežne DNA-nanostrukture bi lahko uporabili kot neke vrste reakcijske nanokomore za kopičenje encimov. Vendar smo v tem trenutku postavljeni pred ključni vprašanja: na kakšen način doseči stabilno podvajanje takšnih DNA-nanostruktur v celici oziroma ali je to sploh izvedljivo?

#### Literatura:

RSA animacija o bionanotehnologiji.

<http://www.youtube.com/watch?v=ITtGJUGXFKc>.

Spletna stran tekmovanja BIOMOD.

<http://biomod.net/>

Spletna stran slovenskega projekta BIOMOD 2011.

<http://openwetware.org/wiki/Biomod/2011/Slovenia/>

BioNanoWizards.

Predstavitveni video slovenskega projekta BIOMOD 2011.

<http://www.youtube.com/watch?v=zpa1YJXFauk>.

Spletna stran Inštituta Wyss.

<http://wyss.harvard.edu/>

Samoza, Á., 2009: *Evolution of DNA Origami*. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (50): 9406–9408.

Rothemund, P. W. K., 2006: *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. *Nature*, 440 (7082): 297–302.

Brayer, K. J., Segal, D. J., 2008: *Keep Your Fingers Off My DNA: Protein-Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 50 (3): 111–131.

Pinheiro, A. V., Han, D., Shih, W. M., Yan, H., 2011:

*Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology*. *Nature Nanotechnology*, 6 (12): 763–772.

**Slovarček:**

**Nukleotid.** Osnovni gradnik molekul DNA in RNA. Poznamo pet osnovnih nukleotidov: adenin, timin, citozin, gvanin in uracil.

**Komplementarnost.** Lastnost osnovnih gradnikov molekule DNA – nukleotidov –, da se z vodikovimi vezmi povezujejo v pare.

**Samosestavljanje.** Proces spontane organizacije neurejene mešanice sestavin na osnovi njihovih lokalnih interakcij.

**ssDNA.** Enoverižna molekula DNA.

**Oligonukleotid.** Kratka enoverižna molekula DNA, tipično dolga od 20 do 50 nukleotidov.

**Tehnologija rekombinantne DNA.** Združuje vse moderne postopke molekularnega kloniranja, s katerimi lahko zaporedja DNA iz različnih virov, naravnih ali umetnih, povežemo v takšna, ki jih sicer v naravi ne bi našli.

**Fuzijski protein.** Fuzijski ali himerni protein dobimo z združitvijo dveh ali več genov, ki sicer vsak zase kodirajo svoj protein.

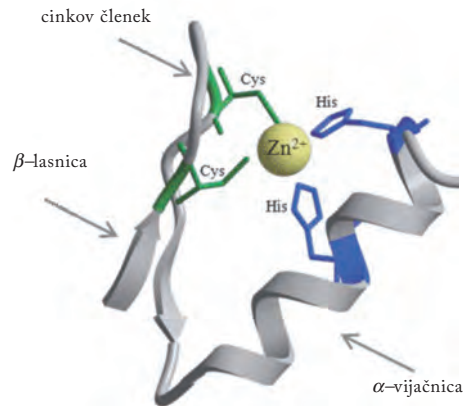
**Cys, His.** Tričrkovni oznaki aminokislin cisteina (Cys) in histidina (His).

**(Proteinska) domena.** Del proteinskega zaporedja in strukture, ki se lahko razvija, funkcioniira in obstaja neodvisno od ostale proteinske verige.

**Encim.** Biološka molekula (protein), ki katalizira kemijsko reakcijo.

**DNA-vezavne domene iz cinkovih prstov.**

Motiv cinkovega prsta je eden najpogostejših motivov v DNA-vezavnih proteinih. Strukturno so zelo raznoliki, najbolj preučeni pa so cinkovi prsti tipa Cys2-His2. Zgrajeni so iz dveh  $\beta$ -trakov (tako imenovana  $\beta$ -lasnica) in ene  $\alpha$ -vijačnice, ki jih stabilizira  $Zn^{2+}$  ion. Vežejo se na zaporedja treh nukleotidov, zaradi njihove modularne strukture pa je mogoče načrtovati sintetične DNA-vezavne domene z novimi specifičnostmi. DNA-vezavne domene v fuzijskih proteinih, uporabljenih v projektu BIOMOD 2011, so vsebovale 3 ali 6 cinkovih prstov, torej so prepoznavale 9 ali 18 nukleotidov.



*Struktura Cys2-His2-cinkovega prsta. Značilno strukturo  $\beta\beta\alpha$  cinkovega prsta tvorita  $\beta$ -lasnica in  $\alpha$ -vijačnica, ki sta stabilizirani s cinkovim ionom. Cinkov členek predstavlja niz aminokislin, ki povezuje oba  $\beta$ -trakova.*

*Iz članka K. J. Brayerja in D. J. Segala, 2008.*



*Jernej Turnšek je lanskega junija končal študij biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Njegovo diplomsko delo z naslovom Sinteznobiološki pristop k izboljšanju karotenoidne biosintezne poti z uporabo cinkovih prstov je bilo nagrajeno z Univerzitetno Prešernovo in Krkino nagrado. Po sodelovanju v dveh študentskih projektih (iGEM 2010 in BIOMOD 2011) v Laboratoriju za biotehnologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani, kjer je bil kasneje tudi zaposlen, je odšel v Združene države Amerike. V Bostonu se je pridružil mlademu biotehnološkemu podjetju Ginkgo BioWorks, kjer se ukvarja z genskim inženiringom mikroorganizmov za produkcijo spojin z visoko dodano vrednostjo. Pri svojem delu se srečuje z modernimi tehnikami molekularnega kloniranja, genomskega inženiringa, bioinformatike, statistike, analize kemije, seznanja pa se tudi z novimi pristopi k računalniški podpori in avtomatizaciji dela v laboratoriju. 26-letni Savinjanec bo konec letošnjega avgusta začel z doktoratom na Univerzi Harvard.*