

**Opis delovanja sistema:** Prvi del sistema sestavlja domena za zaznavanje in pretvorbo mehanskega signala preko  $\text{Ca}^{2+}$  v biološki signal.

V celični membrani se nahaja mehanosenzorski kanalček občutljiv na ultrazvok. Na zunanji strani celične membrane je na kanalček preko scFv pritrjen zračni vezikel, ki ga izdelava celica sama. Sestavljen je iz strukturnega proteina GvpA in proteina GvpC, ki stabilizira strukturo vezikla. Vloga vezikla je povečati učinek ultrazvoka in s tem občutljivost kanalčka na ultrazvok. Na notranji strani celične membrane je kanalček preko tandemskih ponovitev ankirinov vezan na proteine citoskeleta. S tem kanalček zazna deformacijo na zunanji strani, ki jo povzroči ultrazvok glede na stanje v notranjosti. Ob ustrezni stimulaciji kanalčka se le ta odpre in  $\text{Ca}^{2+}$  preidejo v celico.

Del domene, ki je odgovorna za pretvorbo signala  $\text{Ca}^{2+}$  v biološki signal predstavlja komponenta senzor, ki oponaša delovanje ti. "*yellowameleon (YC6.1)*" (BBa\_I757003). Senzor je sestavljen iz N-term. dela kinaze, N-term. dela kalmodulina, peptida CKKp, C-term. dela kalmodulina in C-term. dela kinaze ((**N-Kin**)-(**N-CaM**)-**CKKp**-(**C-CaM**)-(**C-Kin**)). Vezava  $\text{Ca}^{2+}$  na CaM povzroči ovitje okoli CKKp kar vodi v združitev obeh delov split kinaze v aktivno obliko. Aktiven senzor deluje tako, da aktivira komponenti ojačevalec in efektor.

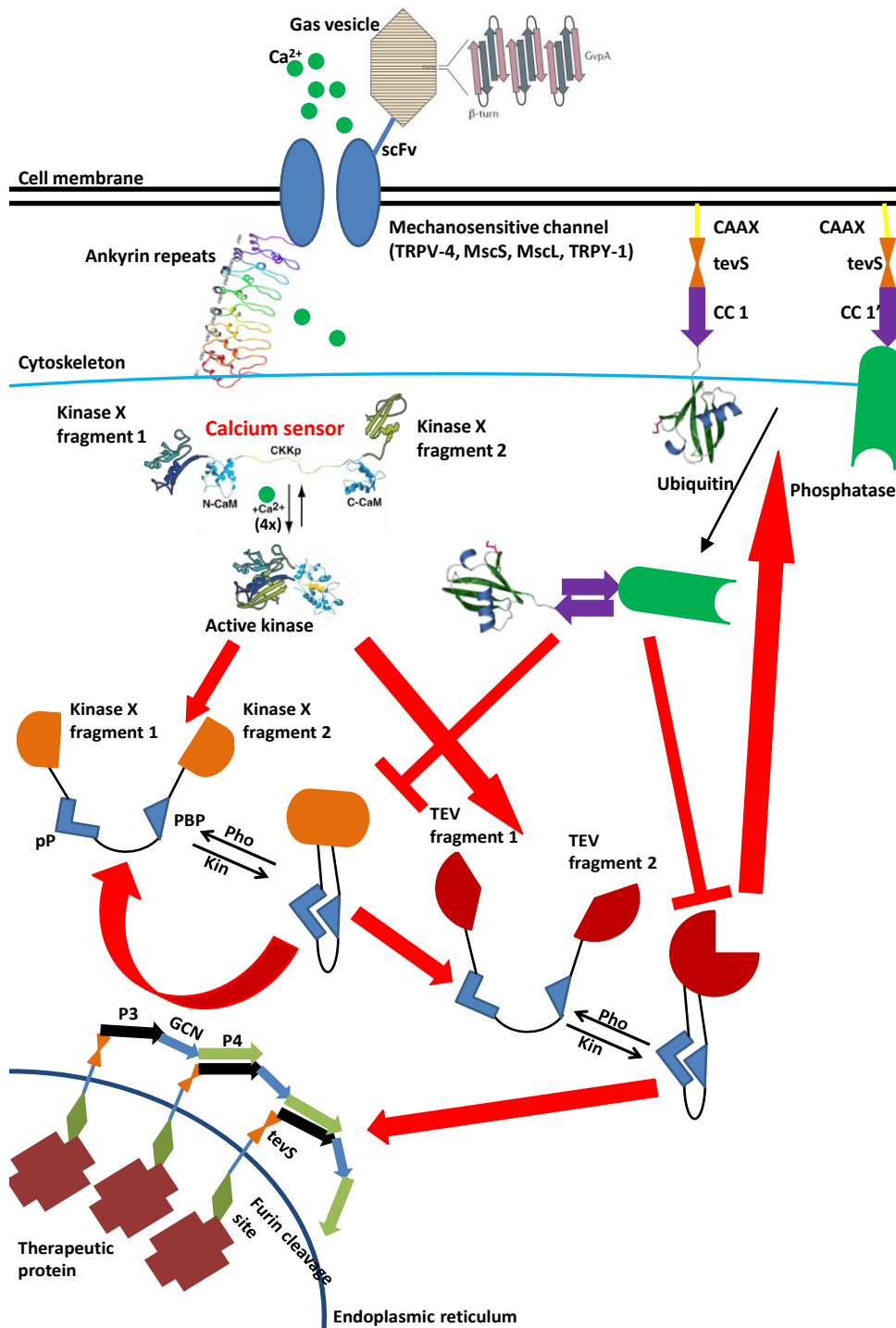
Drugi del sistema predstavlja komponenta ojačevalec, ki je namenjena ojačitvi signala. Sestavljena je iz split kinaze povezane preko "*phospho-binding proteina (PBP)*" in "*phospho peptida (pP)*", ki je substrat kinazi in v neaktivni obliki nefosforiliran ((**N-Kin**)-(**pP**)-(**PBP**)-(**C-Kin**)). Ob fosforilaciji peptida pP s strani sensorja pride do vezave PBP na peptid pP, kar združi oba konca kinaze in jo aktivira. Ojačevalec lahko aktivira še neaktivne komponente ojačevalca tudi, ko ni več stimulacije s strani  $\text{Ca}^{2+}$  sensorja (pozitivna povratna zanka). Ojačevalec aktivira sam sebe in komponento efektor.

Tretji del sistema je sestavljen iz komponente efektor. Efektor je sestavljen iz split proteaze TEV povezane preko pP in PBP ((**N-TEV**)-(**pP**)-(**PBP**)-(**C-TEV**)) in se prav tako kot ojačevalec aktivira s fosforilacijo pP s strani sensorja in ojačevalca. Aktivacija pomeni nastanek aktivne proteaze TEV, ki lahko reže v TEV prepoznavnem mestu (tevS).

Aktivna proteaza TEV cepi tri mesta tevS. Komponenta, ki omogoča agregacijo in inducibilno sproščanje TP iz agregatov se nahaja na membrani ER. Sestavljena je tako, da ima na N-term. delu (v lumnu ER) terapevtski protein in "*furin cleavage site*", sledi še sekvenca, ki vgradi komponento v membrano ER. Na citosolni strani ER se nahaja tevS mesto in tri zavite vijačnice (P3:GCN:P4). Zavite vijačnice omogočajo nastanek agregatov na membrani ER. Agregacija onemogoči potovanje terapevtskega proteina v GA in izločanje iz celice preko veziklov.

Ob aktivaciji proteaza TEV cepi tevS mesto, ki se nahaja na citoplazemski strani ER. Po cepitvi se iz agregatov začne sproščati terapevtski protein, ki lahko zapusti ER in nadaljuje pot do GA. V GA pride še do cepitve s strani proteaze furin, da se TP sprostijo iz membrane GA in nato preko sekretornih veziklov doseže zunanjo stran celične membrane (pride do sproščanja TP).

Proteaza TEV, deluje še na dve mesti tevS, kar povzroči sproščanje ubikvitin-CC (Ub-CC) in fosfataza-CC (Pho-CC), ki sestavljata domeno izklop. Fosfataza odstrani fosfatno skupino iz pP, ki se nahaja na komponenti ojačevalec in efektor. Defosforilacija povzroči inaktivacijo obeh komponent (PBP ne veže več pP in split protein preide v neaktivno obliko). To vodi do prekinitve sproščanja TP iz celice. Ko se ojačevalec in efektor dokončno inaktivirata pride tudi do zaustavitve sproščanja Ub-CC in Pho-CC iz celične membrane. Ker se na Pho-CC lahko veže Ub-CC to vodi v pospešeno razgradnjo fosfataze. Sistem se tako po aktivaciji zaustavi in je zaradi zmanjšane razpolovnega časa (*ang. half life*) fosfataze kmalu pripravljen na ponovno aktivacijo.



Slika 1: Shematski prikaz delovanja sistema.

**Prednosti sistema:** Uravnavanje delovanja sistema z ultrazvokom predstavlja visoko prostorsko in časovno specifičnost aktivacije, brez uporabe invazivnih metod. Ker pride do aktivacije na post-translacijskem nivoju je čas od indukcije do sproščanja TP v primerjavi z indukcijo transkripcije močno skrajšan. Sistem je prilagodljiv in z malo spremembami omogoča izločanje različnih TP ali sočasno izločanje več TP naenkrat. Po aktivaciji se brez dodatnih represorjev ustavi sam in se lahko ponovno aktivira. V primeru, da želimo dolgoročno sproščanje TP, odstranimo komponento izklop in po enkratni aktivaciji sistem zaradi pozitivne povratne zanke ostane aktiven.

**Pomanjkljivosti sistema:** Vprašljivost predstavljajo zračni vezikli, ki so pritrjeni na mehanosenz. kanalček, saj le ti izhajajo iz bakterijskih proteinov in so potencialno imunogeni. Kljub temu, da je sistem hiter ne doseže takšne hitrosti sproščanja kot jo poznamo pri celicah beta v primeru sproščanja inzulina. V našem primeru mora TP še vedno preiti iz ER v GA in nato iz celice. Vprašljiva je tudi komponenta izklop. Idealno bi bilo, da se sistem aktivira hitro, povzroči intenzivno sproščanje TP ter se na to spet hitro povrne v stanje pripravljenosti na ponovno aktivacijo.

**Pomen sistema za sintezno biologijo:** Sistem prinaša novosti na področju biomedicine in bi bil primeren za obliko genske terapije avtolognih celic (podobno kot pri terapiji CAR-T) ali pripravi novih terapevtskih celic. Uporabnost sistema vidim tudi pri pripravi novih prostetičnih naprav. Sistem je lahko prototip in izhodišče za razvoj novih podobnih sistemov, predvsem zaradi možnosti enostavnih modifikacij.

**Tehnična izvedba:** Z metodami molekularnega kloniranja je potrebno pripraviti vse zgoraj opisane konstrukte ter jih vstaviti v vektor, ki se lahko pomnožuje v bakterijskih celicah in episomalno pomnožuje v sesalskih celicah ter. Omogočiti mora tudi konstitutivno izražanje konstruktov (promotor CMV) v sesal. celicah. Zato bi bil primeren vektor pcDNA 3.1. Vsi konstrukti morajo imeti na pravem mestu dodane signalne sekvence, ki jim omogočajo ustrezno lokalizacijo na želeno mesto. Po pripravi konstruktov sledi transfekcija v izbrano sesal. cel. linijo (HEK293T). Za vsak posamezen konstrukt bi najprej preverili ali se v celicah uspešno izrazi. V ta namen bi konstrukte pripravili tako, da bi jim dodali označevalce (*ang. TAG*, npr. FLAG, HA, AU1) ter nato izražanje preverili z metodo Western blot. TAGi bi služili tudi za preverbo pravilne lokalizacije (detekcija s fluorescenčno označenimi Ig s konfokalnim mikroskopom) v primeru mehanos. kanalčka in zračnih veziklov. Testirati bi bilo potrebno več mehanos. kanalčkov (TRPV4, MscL, MscS, TRPY1) in izbrati najprimernejšega. Vdor  $Ca^{2+}$  bi zaznali z barvilom Fluo-3, ki ob vezavi  $Ca^{2+}$  fluorescira. Pravilno sestavljanje senzorja bi preverili tako, da bi pripravili konstrukt, ki bi namesto split kinaze na N in C term. koncu senzorja imel split GFP. Ob povišanju konc.  $Ca^{2+}$  in vezavi  $Ca^{2+}$  bi zaznali fluorescenco GFP (združitev obeh koncev). Nato bi izbrali najbolj primerno split kinazo, ki bi se nahajala na senzorju in ojačevalcu in ni endogeno prisotna. Vzoredno s kinazo bi izbrali tudi ustrezna PBP in pP. Aktivnost senzorja bi zaznali tako, da bi komponenti ojačevalca namesto split kinaze na N in C term. koncu dodali split GFP, ki bi postal aktiven ob fosforilaciji pP s strani senzorja. Aktivacijo efektorja s strani ojačevalca in senzorja bi določili na enak način kot aktivacijo senzorja. Po indukciji sistema s  $Ca^{2+}$  bi ugotavljali hitrost povišanja fluorescence (delovanje kinaze). Zaradi pozitivne povratne zanke v delovanju ojačevalca pričakujemo hitrejši dvig fluorescence. Za dokazovanje nastanka agregatov na površini ER s pomočjo P3GCN:P4 bi pripravili konstrukta iz komponente, ki omogoča agregacijo, le, da bi namesto TP vsebovala eCFP oziroma eYFP. Pri agregaciji bi prišlo do pojava FRET katerega bi zaznali s fluorimetrom. Delovanje efektorja bi določili s pripravo konstrukta za agregacijo kjer bi TP nadomestil GFP. Po aktivaciji bi s konfokalnim mikroskopom gledali potovanje GFP iz ER v GA in nato iz celice. V supernatantu bi detektirali količino GFP pred aktivacijo in po njej. Ker bi uporabili GFP s TAGom bi bila primerna metoda za detekcijo Western blot. Izklop bi preverili tako, da bi med obstoječe komponente dodali split GFP povezan s pP in PBP. S fluorimetrom bi po indukciji s  $Ca^{2+}$  spremljali dvig fluorescence (delovanje senzorja in ojačevalca) ter nato ugotavljali čas, ki je potreben, da se nivo fluorescence povrne na bazalni nivo (delovanje izklopa). V tem primeru bi morali uporabiti mutanto GFP (ali kateri drug fluorescenčni protein), ki omogoča reverzibilnost split reporterja.