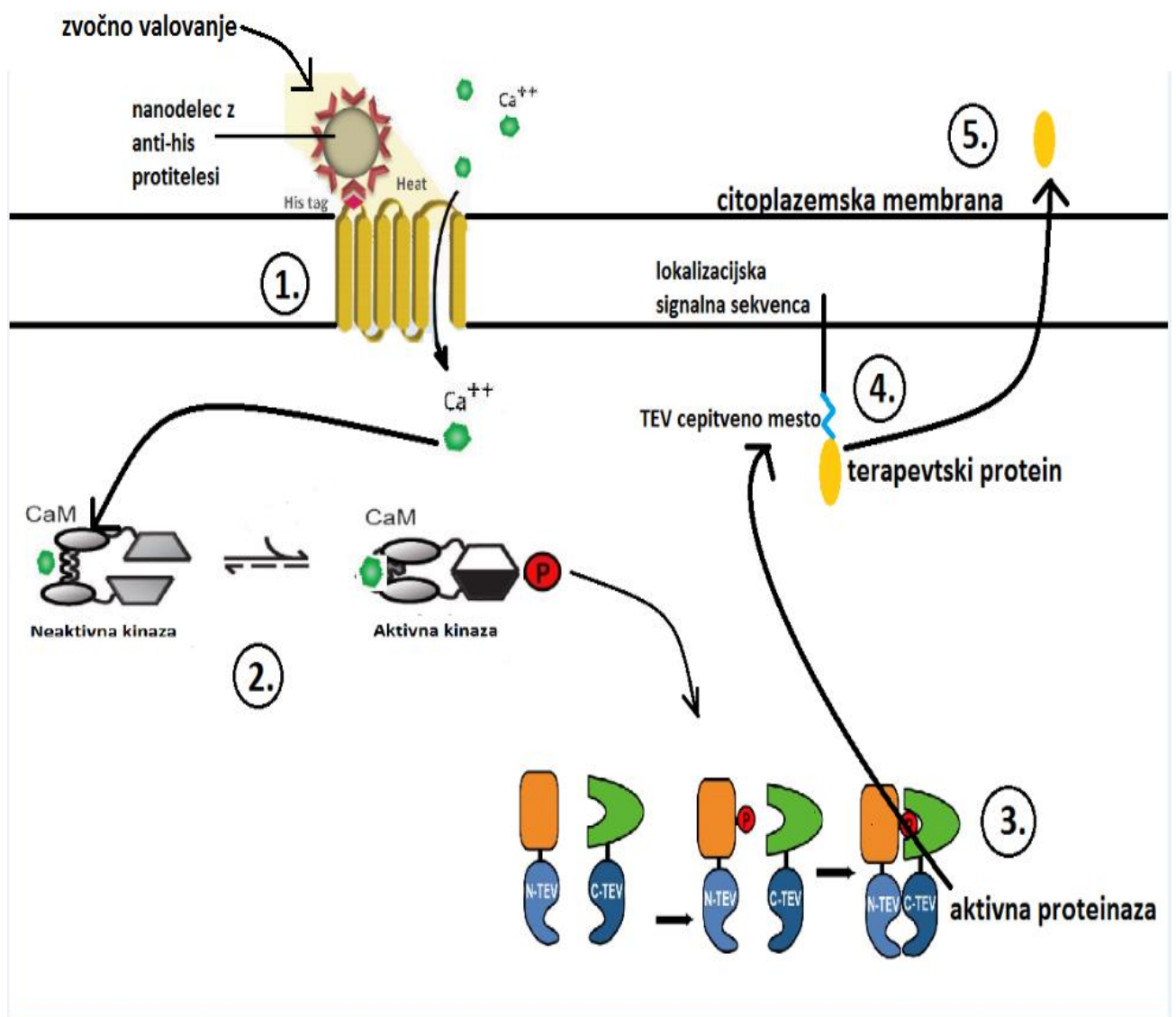


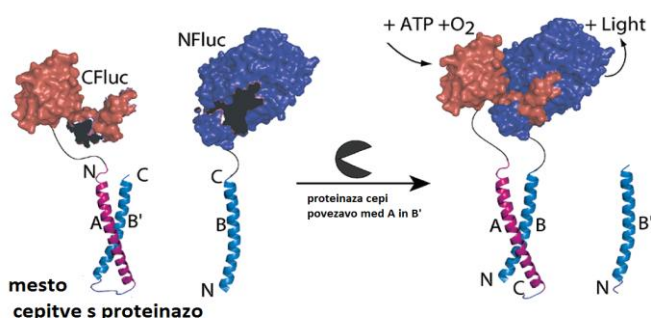
## Predstavitev ideje za prijavo v ekipo iGEM – Tjaša Plaper

Regulacija celičnega odziva na okoljske dejavnike je ključnega pomena za njeno preživetje. Večina kaskadnih transdukcij vodi v spremembo genskega izražanja. To pomeni, da preden se celica odzove, poteče transkripcija in translacija oziroma proteinska sinteza. Da bi odziv skrajšali, želimo regulacijo narediti na proteinskem nivoju. Kot model nam služijo peptidni hormoni, katerih delovanje je regulirano na nivoju izločanja. Lotila sem se pristopa regulacije z uporabo cepljenih proteinov, ki je široko uporabljen, saj nam omogoča natančno regulacijo uporabljenega proteina, ter indukcije sistema z zvokom.

Shema signalne transdukcije



1. Z zvokom oziroma ultrazvokom induciramo celični odziv. Zaznavajo ga mehansko občutljivi ionski kanali. Uporabimo lahko kanal TRP-4, ki ga aktiviramo z ultrazvokom, pri čemer za aktivacijo potrebujemo tudi mikromehurčke za prenos valovanja (Ibsen S. in sod., 2015). Uporabimo pa lahko tudi modificiran TRPV1, ki mu dodamo histidinski rep (sestavljen iz 6 histidinov), na katerega bi se vezali nanodelci označeni s protitelesi proti his. Zaradi delovanja zvoka pride do lokalnega segrevanja in odprtja kanala ter vdora kalcijevih ionov (primer tega kanala sem prikazala tudi na shemi) (Stanley S.A in sod, 2012). Nanodelce lahko na kanal vežemo tudi na citoplazmatski strani (Stanley S.A in sod, 2015). Vdor kalcija v celico bi lahko preverili z dodatkom GcaMP kalcijevega senzorja, ki temelji na kalmodulinu. Vezava kalcija sproži konformacijsko spremembo senzorja in oddajanje fluorescence (Akerboom in sod., 2012). Optimizacija količine kalcija, ki vdre v celico je pomembno, saj je previsoka znotrajcelična koncentracija kalcija signal za apoptozo. Zato je pomembna optimizacija trajanja zvočnega signala. Delovanje kanala TRPV1/ TRP-4 bi preverila z dodatkom antagonista (na primer kapsazepin).
2. Znotraj celice bi se kalcij vezal na modificirano molekulo kalmodulina. Konstrukt bi bil sestavljen iz kalmodulina, ki bi imel na sebi vezano cepljeno kinazo. Vezava kalcija povzroči znano konformacijsko spremembo kalmodulina, s čimer bi prišlo do sestavitve kinaze v aktivno obliko. Na podoben način so naredili fuzijo kalmodulina in beta laktamaze (Meister in Joshi, 2013). Aktivnost oziroma pravilno sestavljanje kinaze, bi preverila z izolacijo encima in dodatkom substrata (inkorporacija  $^{32}\text{P}$  v proteinski substrat (Chamacho- Soto K. In sod., 2014)).
3. Aktivna kinaza bi s fosforilacijo omogočila približanje dveh proteinov, kar bi sestavilo proteinazo TEV (prikazano na shemi) ali cepljeno kaspazo. Polovici proteinaze bi vezali na proteina, za katera vemo, da prideta v stik, če je eden izmed njih fosforiliran (Wehr in sod., 2008). Ustreznost sestavljanja cepljene proteinaze bi preverila s pomočjo avtoinhibirane cepljene luciferaze (Shekhawat in sod., 2009).



4. Aktivna proteinaza bi cepila tarčno mesto membransko lokaliziranega proteinskega konstrukta s terapevtskim proteinom. Znanih je več že uporabljenih signalnih (lokalizacijskih) sekvenc (VanEngelenburg S.B. in Palmer A.E., 2008).
5. Terapevtski protein bi se po cepitvi izločal iz celice. Izločanje bi preverila z ELISA testom.

Ustreznost zaporedij DNA konstruktov bi preverila s pomočjo določanja nukleotidnih zaporedij. Transfekcijo DNA konstruktov in njihovo izražanje bi naredila v celični liniji HEK293. Funkcionalnost proteinov bi preverila z izolacijo s pomočjo afinitetne kromatografije na Ni-NTA nosilcih (konstruktom dodamo histidinski rep). Izražanje proteinov in njihovo čistost bi preverila z ločevanjem proteinov po velikosti na SDS poliakrilamidni elektroforezi. Koncentracijo proteinov bi določila spektrofotometrično ali z metodo BCA.

Težavna je izbira mesta pri izdelavi cepljenih proteinov, da po sestavljanju tvorijo aktivno obliko, kot so pokazali v članku, kjer so pripravili več cepljenih kinaz za testiranje kinaznih inhibitorjev (Camacho-Soto K. in sod., 2014). Terapevtski protein bi lokalizirala na citoplazmatskem delu membrane, kar pomeni, da bi bil lahko izpostavljen citoplazemskim proteazam in cepitev ne bi bila specifična. Prav tako sama lokalizacija proteina na membrani in njegova cepitev z aktivirano proteinazo ne zagotovi izločanja proteina kar je pomanjkljivost.

Predlagana ideja je inovativen pristop k regulaciji kaskadne transdukcije v celici, saj cepljena kinaza na molekuli kalmodulina še ni bila narejena. Tak konstrukt nam omogoča regulacijo kaskadne signalizacije preko delovanja kinaze. Prav tako je pomemben pristop regulacije z zvokom, ki predstavlja novo in neinvazivno metodo celične regulacije in je primerljiv z ultrazvočno preiskavo ploda med nosečnostjo, v primerjavi s svetlobo, kjer je potreben fizičen dostop do mesta delovanja. Modelni sistem bi lahko aplicirali na regulacijo celičnega delovanja: aktivacija ali inhibicija tarčnih (terapevtskih) proteinov.

## Citirani viri

- Akerboom in sod. 2012. Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging
- Camacho-Soto K., Castillo-Montoya J., Tye B., Ghosh I. 2014. Ligand-gated split-kinases.
- Ibsen S., Tong A., Schutt C., Esener S., Chalasani S. H. 2015. Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*.
- Meister G. E., Joshi. N. S. 2013. An Engineered Calmodulin-Based Allosteric Switch for Peptide Biosensing.
- Shekhawat S. S., Porter J. R., Sriprasad A., Ghosh I.I. 2009. An Autoinhibited Coiled-Coil Design Strategy for Split-Protein Protease Sensors
- Stanley S. A ., Sauer J., Kane R. , Dordick J. S., Friedman J.M. 2015. Remote regulation of glucose homeostasis in mice using genetically encoded nanoparticles.
- Stanley S. A., Gagner J. E. , Damanpour S., Yoshida M., Dordick J. S., J. M. Friedman J. M. 2012. Radio-Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice.
- Wehr M. C., Reinecke L., Botvinnik A., Rossner M. J. 2008. Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV.
- VanEngelenburg S.B., Palmer A.E. 2008. Fluorescent biosensors of protein function.