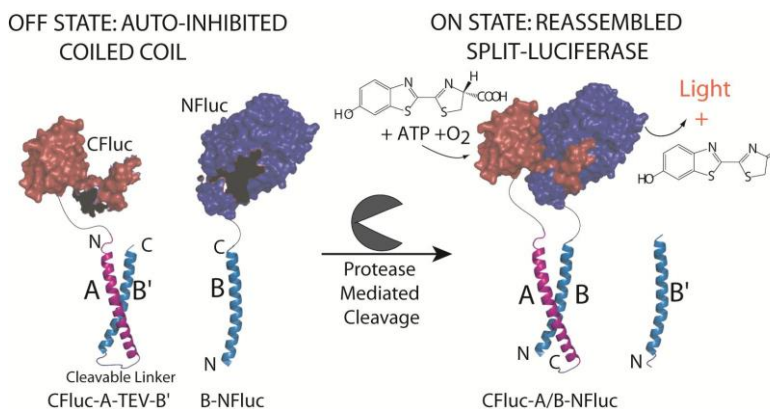


OPIS PROJEKTA

Sposobnost živih organizmov, da povzročijo spremembo v celici v časovnem obdobju nekaj minut oz. sekund (postratnslacijske modifikacije) ali celo milisekund (akcijski potencial), predstavlja potrebo po sinteznobioloških konstrukcijskih, ki bi omogočali enako hiter odgovor. Kot svoj projekt predlagam kombinacijo dveh sistemov, ki sta že bila vsak zase že uspešno izražena v sesalskih celicah celične linije HEK293, in skupaj omogočata številne aplikacije.

Združili bi sistem, ki preko receptorja TRPV1 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) omogoča odziv sesalskih celic na ultrazvočno valovanje (UZ) in povzroči vdor Ca^{2+} ionov v citosol, in sistem, ki temelji na ponovni aktivaciji proteina ob interakciji dveh samostojno zvitih, a neaktivnih delov proteina (split-protein) preko obvitih vijačnic. Sistem povezave dveh delov luciferaze preko obvitih vijačnic po proteolizi avtoinhibitorne vijačnice je bil opisan kot sistem za detekcijo proteaz (Shekhawat SS *et al.*, 2009). Avtoinhibicija in formacija aktivnega proteina po proteolizi sta podrobneje prikazani na sliki 1.



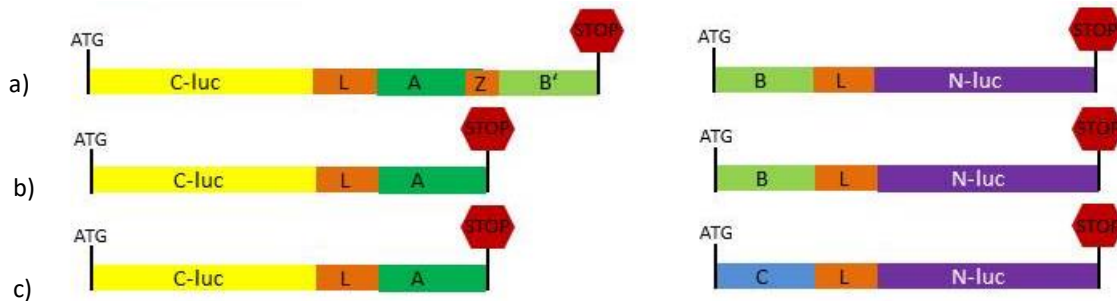
Slika 1: Avtoinhibicija z obvitimi vijačnicami v primeru fragmentirane luciferaze. Linker med vijačnicama cepi TEV proteaza (Shekhawat SS *et al.*, An autoinhibited coiled-coil design strategy for split-protein protease sensors, 2009). Vijačnici A in B ob interakciji tvorita obvito vijačnico. Nukleotidno zaporedje B in B' vijačnice je enako, različni oznaki omogočata lažje ločevanje med tem na kateri molekuli se vijačnica nahaja.

Oba sistema bi povezali tako, da zanko med vijačnico A in B' cepimo z od Ca^{2+} odvisno proteazo iz družine kalpainov – kalpainom I. Peptidno zaporedje, ki ga med levcinom in metioninom preferenčno cepi kalpain I je PFFLL-MER, določili pa so ga Cuerrier *et al.* (2005). Z uvedbo tega zaporedja v zanko med A in B' vijačnico bi dobili od Ca^{2+} odvisno cepitev zanke in interakcijo med C in N delom proteina.

Celice, ki se odzivajo na ultrazvok, so po informacijah iz uvodnega predavanja že pripravljene*. Za reporterski protein, ki bi bil zasnovan kot protein v dveh delih (split-protein) in bi preko njegove aktivnosti lahko zaznavali ali kombinacija sistemov deluje, bi izbrali luciferazo. Njena odlika je, da zaradi dobre kvantifikacije omogoča določitev parametrov (npr. kako dolgo časa po stimulaciji pride do največjega odziva in kolikšna je takrat koncentracija aktivne luciferaze), poleg tega pa se večkrat uporablja kot protein v dveh delih (N-del=N-luc, C-del=C-luc). Cepitev zanke je irreverzibilna, zato bo luciferaza aktivna dokler se ne razgradi v proteasomu. Za detekcijo bi celice lizirali, dodali luciferin in pomerili luminiscenco. Alikvot celic za detekcijo bi odvzeli ob različnih časih po stimulaciji celic, da bi lahko spremljali razvoj luminiscence, ki predstavlja odziv sistema, s časom. Celotna shema projekta (v nadaljevanju 'celoten sistem') je prikazana na sliki 3.

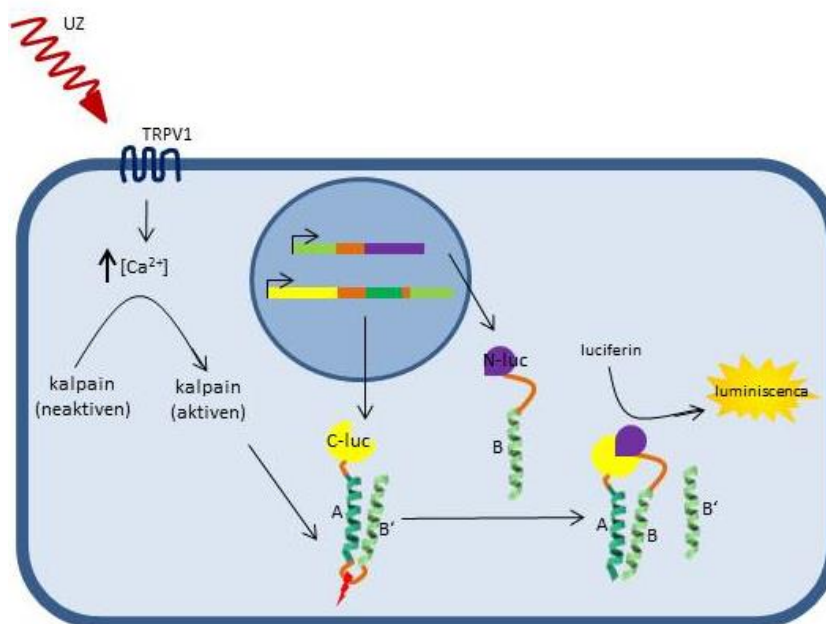
* Glede na posredovane članke predvidevam, da gre za podoben princip kot so ga opisali Stanley *et al.* (2015) - odziv na UZ omogoča TRPV1 oz. podoben mehanizem, ki povzroči vdor Ca^{2+} ionov v citosol. V primeru, da sistem za odziv na UZ ni vstavljen v celice HEK293 ga lahko ali prestavimo vanje (transficiramo) ali izvedemo poskus na celicah v katere je že vstavljen.

Zapisa za oba dela luciferaze bi vstavili v isti vektor, da bi zagotovili enako število kopij obeh v celici in s tem čim bolj podobno raven izražanja. Konstrukta obeh delov luciferaze, pozitivna in negativna kontrola so shematsko predstavljeni na sliki 2.



Slika 2: Shema konstruktov. L predstavlja linker, Z pa zanko, ki jo lahko cepi kalpain. A in B sta vijačnici, ki tvorita obvito vijačnico, C predstavlja vijačnico, ki z vijačnico A ne tvori obvite vijačnice. a) Konstrukta s C-delom luciferaze (C-luc, levo) in N-delom luciferaze (N-luc, desno). b) Pozitivna kontrola c) negativna kontrola.

Da bi ob stimulaciji z UZ dobili kar najhitrejši možen odgovor, bi konstrukte postavili pod konstitutivni promotor, vsak konstrukto pa potrebuje tudi svoje vezavno mesto za ribosom. Za izražanje bi izbrali sesalsko celično linijo HEK293 saj sta bila na njih preizkušena oba sistema, katerih delovanje želim združiti s svojim projektom, in izražajo običajne sesalske proteine, med njimi tudi kalpain I. Glede na to, da sta oba sistema že preizkušena na HEK293 celicah pri izvedbi projekta ne bi pričakovali prevelikih težav, vendar se te kljub temu lahko pojavijo.



Slika 3: Shema delovanja celotnega sistema. Zaradi preglednosti so v jedru prikazani samo konstrukti brez promotorjev, vektorjev, in mest za vezavo ribosoma. Barve posameznih delov konstruktov v jedru sovpadajo s sliko 2. Ultrazvočno valovanje (UZ) povzroči dvig temperature, ki aktivira TRPV1. Aktiviran TRPV1 povzroči vdor Ca^{2+} iz ekstracelularnega prostora in znotrajceličnih kompartmentov. Ob povišani koncentraciji Ca^{2+} kalpain postane aktiven in cepi zanko med vijačnicama A in B, kar omogoči tvorbo obvite vijačnice med vijačnicama A in B se tudi C-luc in N-luc dovolj približata, da interagirata in tvorita aktivno luciferazo. Po dodatku luciferina lahko detektiramo luminiscenco.

Poleg potrebe po morebitni optimizaciji pogojev kloniranja se lahko zgodi, da eno od zaporedij, ki jih želimo vstaviti v celico vsebuje restrikcijsko mesto za encim, ki se uporablja po standardnih depozitorija iGEM. V tem primeru je na tem mestu potrebno uvesti tiho mutacijo v nukleotidno zaporedje tako, da restrikcijskega mesta ni več. Težave lahko predstavlja tudi transfekcija in sama stabilnost sesalske celice z več plazmidi. Transfekcijo lahko izvedemo s sistemom CRISPR-Cas, vendar moramo v celice prej vnesti potrebne plazmide.

Pri detekciji lahko naletimo na nizko aktivacijo ali njeno odsotnost. To je lahko posledica prekratkega časa gojenja celic, da bi se izrazilo dovolj C in N-luc. Poleg tega, da bi luminiscenco detektirali v različnih časih po stimulaciji z UZ, bi morali vzorce celic pred stimulacijo odvzeti po različnih časih gojenja, da bi določili kdaj se je izrazilo dovolj C- in N-luc.

Nizka aktivacija je lahko tudi posledica močne interakcije med A in B' vijačnico po cepitvi. To lahko odpravimo tako, da povečamo delež B-N-luc (preden lahko vstavimo močnejši rbs kot pred C-luc-A-B') ali pa namesto B' izberemo vijačnico D, ki sicer tvori obvito vijačnico z A, vendar z manjšo afiniteto kot vijačnica B. Zaradi prostorske bližine med A in D pred cepitvijo lahko predvidevamo, da bo vseeno prišlo do avtoinhibicije, vendar bo po cepitvi bolj verjetna tvorba obvite vijačnice med A in B in s tem aktivacija luciferaze. Možen razlog za pomanjkanje aktivacije pa je tudi neučinkovita cepitev zanke med A in B' ali pa nespecifična cepitev zanke s katero od od Ca^{2+} neodvisnih proteaz, kljub temu, da cepitev za velikimi hidrofobnimi aminokislinami ni najbolj pogosta.

Cepitev zanke, ki povezuje A in B' vijačnico lahko preverimo tako, da izrazimo C-luc-A-B' in B-N-luc v celicah, jih liziramo in dodamo kalcijeve ione v obliki soli do končne koncentracije med 5 in 50 μM – območje v katerem je kalpain I aktiven (Khorchid in Ikura, 2002) ter izmerimo odziv (luminiscenco). Če odziva ne zaznamo, in sumimo, da do cepitve ni prišlo v bakterijah pripravimo vzorce A-B' z različnimi zaporedji zanke (zasnovane na osnovi druge literature) in kalpaina I. S citosolnimi koncentracijami ionov in povečano koncentracijo Ca^{2+} izvedemo proteolizo in dobljene vzorce naneseemo na SDS-PAGE ter glede na velikost in število lis določimo ali je do cepitve prišlo.

Celotni sistem bi omogočal neinvazivno regulacijo aktivnosti luciferaze s hitrim in časovno opredeljenim zamikom odziva na ultrazvočni signal. Z uporabo luciferaze bi dokazali, da smo zasnovali sistem, ki omogoča hiter odgovor na neinvazivno in preprosto administriran signal. V ta sistem lahko namesto N- in C-dela luciferaze vstavimo N- in C-del proteina (npr. takšnega, ki proizvaja nizkomolekularna zdravila) ali par proteinov (npr. transkripcijskih faktorjev - TF), ki proizvaja ali vpliva na izražanje zdravilne učinkovine še po prenehanju signala.

Komponente predlaganega sistema z luciferazo so relativno dobro definirane in že preizkušene, zato bi nam v primeru, da ne bi naleteli na večji del prej opisanih težav in delujoč sistem relativno hitro izrazili v celicah, ostalo dovolj časa, da bi primer terapevtske uporabe izvedli v okviru projekta iGEM. Namesto N- in C-luc bi uporabili DNA vezavno domeno transkripcijskega faktorja GAL4 in aktivacijsko domeno VP-16. Nobena od njiju se ne more samostojno vezati na DNA, zato je – po sistemu opisanem zgoraj – potrebna interakcija A in B vijačnice, ki pa je možna le po aktivaciji kalpaina. Aktiven TF se veže na promotor P_{GAL4} . Uporaba TF namesto citosolnega proteina sicer zmanjša hitrost odziva, vendar omogoča sekrecijo proteinov, kar močno razširi uporabnost sistema.

Tabela 1: Nekaj primerov potencialne uporabe proteina R za lajšanje in zdravljenje bolezni

Protein R	Bolezen
faktor strjevanja krvi VIII, XI ali XI	hemofilija
plazemski C8 (komponenta komplemента)	bolezni povezane s kroničnim vnetjem
faktor H	s starostjo povezana degeneracija rumene pege (AMD)

Protein R, ki ga želimo uporabiti v terapevtske namene, bi vstavili v vezje pod promotor P_{GAL4} . Da ne bi prišlo do previsokega izražanja R, bi pod isti promotor vstavili tudi gen za represor P_{GAL4} . Vgradnja takšnih celic na primernem nosilcu v bližino žile bi lahko preko izražanja manjkajoče komponente ali

ustreznega inhibitorja zdravila ali pa vsaj lajšala številne bolezni (npr. motnje strjevanja krvi in sistema komplementa - Tabela 1).