

Prijava za članstvo v ekipi iGEM 2016

Predlog projekta:

Idejo sem si zamislil tako, da bi za dimerizacijo split proteina izkoristil lastnost calmodulina, da spremeni svojo konformacijo, ko veže štiri Ca^{2+} ione. Za izvedbo poskusa bi uporabil sesalske celice HEK293T, ki bi v genomu že imele gen, ki kodira za kalcijeve kanalčke odzivne na ultrazvok (v primeru, da take celice ne bi bile na voljo, bi gen za kalcijeve kanalčke vstavil v plazmid). V drug plazmid bi vstavil gene, ki bi kodirali za calmodulin, na katerega bi bil preko linkerjev vezan split protein. Ko bi na celice aplicirali ultrazvok, bi se kanalčki odprli in v celicah bi se koncentracija kalcija povečala, kar bi zaznal calmodulin. To bi vodilo do spremembe konformacije calmodulina in posledično bi se oba fragmenta split proteina združila. Od tu naprej pa bi lahko sistem imel dve različni izvedbi. V prvi izvedbi, bi bil ta split protein kinaza, ki bi potem preko fosforilacije sprožila aktivacijo reporterja. V kolikor ta izvedba ne bi delovala, sem si zamislil še drugo izvedbo. V tem primeru pa bi na calmodulin bila vezana fragmenta TEV proteaze, ki bi s cepitvijo linkerja omogočila povezavo med dvema coiled coiloma, na katera bi bila vezana fragmenta reporterskega proteina. Reporterski protein bi se lahko za morebitne aplikacije zamenjal s terapevtskim proteinom.

Prednosti:

- ✓ Ultrazvok je kot vhodni signal bolj primeren svetlobe, saj prehaja skozi tkiva, ko uporabimo kot vhodni signal svetlobo pa je potrebno organizem na to še ustrezno pripraviti oz. v primeru ko stimuliramo celice v možganih je potrebno narediti »luknjo« zato da svetloba pride do ustreznih celic.
- ✓ Že preizkušene komponente; kolikor mi je znano imate v laboratoriju že izkušnje z delom s TEV proteazo ter coiled coils
- ✓ Delujoče komponente; split TEV proteaza je že bila narejena, tudi sprememba konformacije calmodulina se je že uporabila kot senzor za kalcij
- ✓ Lahko nadzorujemo količino aktivnega proteina, ki jo želimo; ko prenehamo dovajati ultrazvok se koncentracija kalcija v celici zmanjša, posledično se spremeni konformacija calmodulina in TEV proteaza postane neaktivna

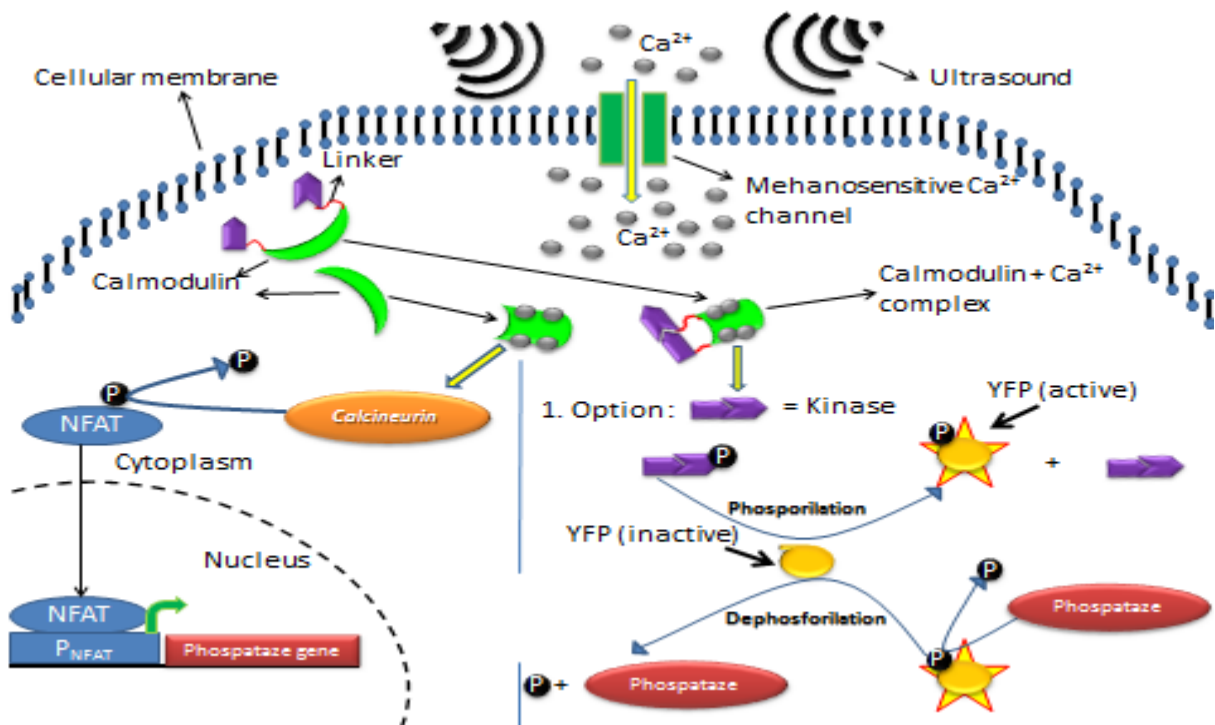
Možni problemi/pomanjkljivosti:

- ❖ Preveliko povišanje kalcija v celici lahko vodi do agregiranja drugih proteinov
- ❖ Prevelika jakost ultrazvoka lahko celicam škoduje
- ❖ Zaradi ultrazvoka bi lahko prišlo tudi do segregiranja gojišča ter celic. Morebitna rešitev bi lahko bila uporaba vodne kopeli, ki bi oblikovala mikrotitrsko ploščo in tako vzdrževala stalno temperaturo.
- ❖ Drugi izziv bi bil tudi zagotoviti, da bi vse celice dobile enako močan signal ultrazvoka

Vpliv na razvoj sintezne biologije

Na področju sintezne biologije je že dlje časa prisotna želja ter potreba po hitrem celičnem odzivu, ki ne bi temeljil na transkripciji in translaciji. Predlagani sistem predstavlja prav to, saj bi posamezne komponente sistema v celici že bile prisotne, vendar bi bile neaktivne. Ko pa bi dodali ustrezen vhodni signal, v tem primeru ultrazvok, bi posledičen vdor kalcijevih ionov v celice sprožil celoten proces, katerega končni produkt bi bil v predlaganem primeru bil aktiven fluorescenten protein, ki bi ga lahko zaznali na konfokalnem mikroskopu. V morebitnih aplikacijah pa bi se ga lahko zamenjalo s terapevtskim proteinom, recimo insulinom ali pa bi signalno pot razvili naprej, da bi vodila do fiziološkega odziva celic/tkiva na dražljaj.

Prva možnost:



V tem primeru bi sprememba konformacije calmodulina vodila do aktivacije kinaze, ki bi s fosforilacijo aktivirala YFP. Hkrati bi vdor kalcija v celico zaznal nespremenjen calmodulin, ki bi preko aktivacije calcineurina in defosforilacije NFAT-a aktiviral transkripcijo gena za fosfatazo. Na ta način bi zaradi dimerizacije kinaze najprej prišlo do fosforilacije in aktivacije YFPja, hkrati pa bi se začela tudi transkripcija fosfataze, ki bi YFP kasneje defosforilirala in na ta način deaktivirala. Fluorescenco YFPja bi nato preveril pod konfokalnim mikroskopom.

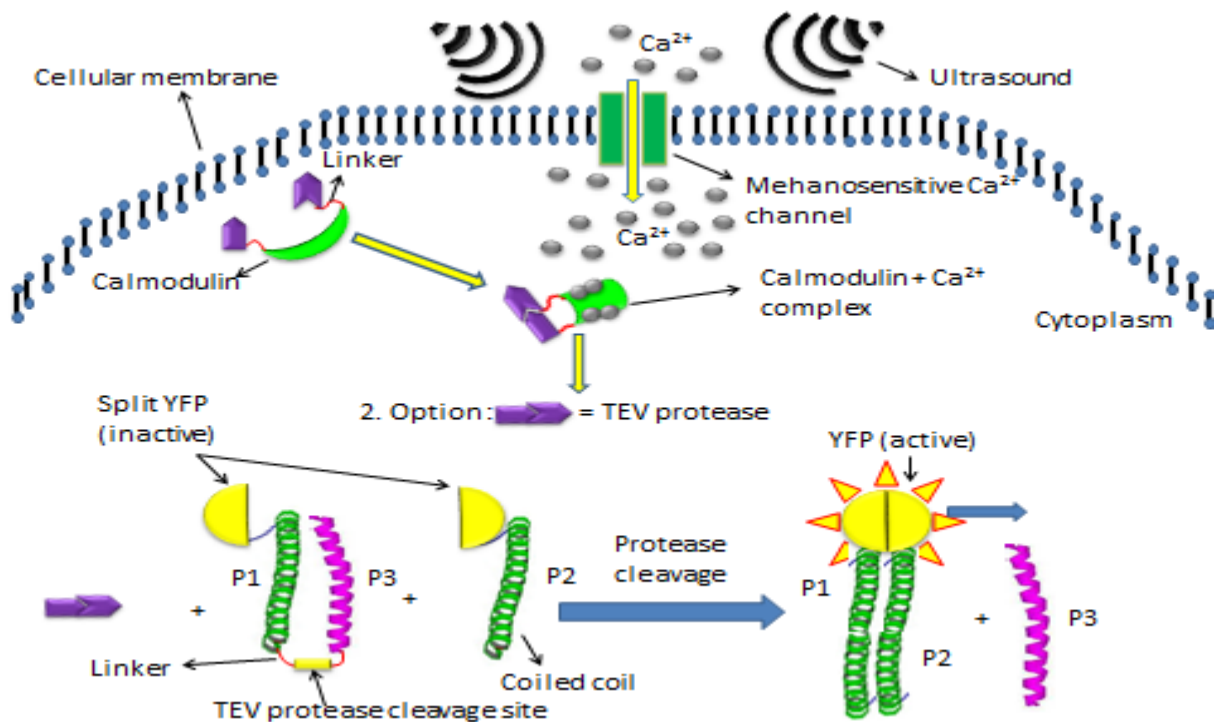
Prednosti:

- ✓ Proces je reverzibilen

Možni problemi/pomanjkljivosti:

- ❖ Potrebno bi bilo narediti ustrezno modificirano kinazo ter fosfatazo, ki bi fosforilirali/defosforilirali YFP. Prav tako bi bilo potrebno narediti YFP, ki ni aktiven dokler ni fosforiliran, kar bi lahko zahtevalo veliko časa.

ALTERNATIVA:



Ko bi zaradi spremembe konformacije calmodulina prišlo do združitve obeh fragmentov TEV proteze, slednja postala aktivna in lahko cepila vez med zelenim (P1) ter vijoličnim (P3) coiled coilom na sliki. Posledično bi se lahko povezala oba zelena (P1 in P2) coiled coila, na katere sta vezana fragmenta YFPja. Fluorescenco YFPja bi nato preveril pod konfokalnim mikroskopom.

Prednosti:

- ✓ Možna inaktivacija; ko nehamo dovajati ultrazvok se koncentracija kalcija v celici postopoma zmanjša, zaradi česa se ponovno spremeni konformacija calmodulina in TEV proteza se inaktivira
- ✓ Delujoče in preverjene komponente; Kolikor mi je znano imate v laboratoriju že izkušnje s TEV protezo ter coiled coili, split TEV proteza je že bila narejena

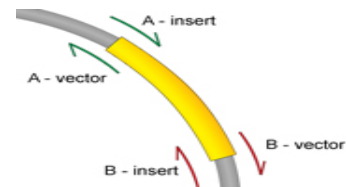
Možni problemi/pomanjkljivosti:

- ❖ Proces ni reverzibilen

Tehnična izvedba:

1. Priprava konstruktov: molekularno kloniranje

Če bi bili ustrezni fragmenti na voljo v laboratoriju, vendar v različnih plazmidih, bi načrtoval začetne oligonukleotide, ki bi imeli 5' konec začetnega oligonukleotida identičen sosednjemu segmentu in 3' ki je komplementaren tarčni sekvenci (Slika1). Pazil bi tudi da imam zraven fragmentov restrikcijska mesta za encime. Tako načrtovane začetne oligonukleotide bi nato naročil. V kolikor ustreznega fragmenta še ne bi bilo v laboratoriju pa bi zraven ustreznih začetnih oligonukleotidov naročil še sintetičen gen. Nato bi izvedel PCR in na ta način dobil ustrezne fragmente. Slednje bi ločil na agaroznem gelu in jih nato iz njega izrezal ter jih izoliral s pomočjo kita za izolacijo iz gela. Tako izolirane fragmente bi nato rezal z restrikcijskim encimom DpnI. Ta encim bi



Slika 1: Začetni oligonukleotidi
(<https://www.addgene.org/plasmid-protocols/gibson-assembly/>
14.2.2016)

razrezal metilirano DNA, zato bi mi ostala samo DNA, ki se je pomnožila s PCR reakcijo in ni metilirana. Po reakciji bi fragmente ponovno ločil na agaroznem gelu, jih izrezal in nato izoliral. Zatem bi naredil Gibson assembly. Tega bi se lotil tako, da bi ustrezne fragmente dodal v skupno epico ter dodal primerno količino Gibson mastermixa, ki vsebuje vse potrebne encime (eksonukleazo, DNA polimerazo ter DNA ligazo), da se fragmenti združijo. Nato bi naredil transformacijo, na ta način bi plazmide vnesel v *E.coli* in jih drug dan izoliral z kitom. Da bi preveril, ali so se fragmenti pravilno sestavili bi naredil kontrolno restrikcijo. Plazmid bi rezal z ustreznimi restrikcijskimi encimi in nato dobljene fragmente pogledal na agaroznem gelu. Plazmide katerih fragmenti bi bili ustreznih dolžin bi nato poslal na sekveniranje, da bi bil prepričan da tekom celotnega procesa ni prišlo do mutacij ter da je v plazmidu res pravi insert.

2. Preverjanje delovanja kalcijevih kanalčkov ter optimizacija trajanja, jakosti ter frekvence ultrazvoka

Ali kalcij sploh prehaja v celice (uporabil bi HEK293T) ob stimulaciji s ultrazvokom bi preveril z uporabo različnih barvil, s katerimi se zaznava koncentracija kalcija v celici (Fura-2 (F-1200); Indo-1 (I-1202); Calcium Green-1 (C-3010)). Rezultate bi nato preveril na napravi, ki meri fluorescence iz mikrotitrskih plošč.

3. Priprava načrtov transfekcije

Ko bi vedel, da kalcij ob stimulaciji z ultrazvokom zagotovo prehaja v celice bi si pripravil načrt transfekcije. Najprej bi bilo potrebno optimizirati količine posameznih plazmidov za naš celoten proces. Transfekcijo bi izvedel na mikrotitrski plošči, za vsako koncentracijo plazmidov ni naredil 4 ponovitve (4 luknjice). Kot transfekcijski reagent bi uporabil PEI. Pri prvi transfekciji bi najprej preiskusil ali je dimerizacija split proteinov zaradi spremembe konformacije calmodulina možna. To bi naredil tako, da bi na calmodulin preko linkerjev vezal fragmente GFPja in preveril ali po aplikaciji ultrazvoka na konfokalnem mikroskopu zaznam svetlobo. Potrebno bi bilo tudi ločeno preveriti ali je YFP po fosforilaciji oz. dimerizaciji obeh coiled coilov aktiven. Ko bi vse komponente delovale, bi jih nato združil vse v eni transfekciji.

4. Merjenje aktivnosti reporterskih proteinov s konfokalnim mikroskopom

Vseskozi bi aktivnost reporterskih proteinov meril s pomočjo konfokalnega mikroskopa.