

Predlog projekta za iGEM tekmovanje 2016

Pregled projekta:

- Konstitutivno izražanje genov
- Sortiranje v sekretorne vezikle z reguliranim izražanjem
- Odprtje Ca²⁺ kanalčka ob delovanju ultrazvoka
- Regulirano sproščanje terapevtskega proteina v okolico

Načrt projekta

Projekt je zgrajen na osnovni ideji o hitrem odzivu celic na zunanji signal.

Predstavljam sistem z ultrazvokom regulirane od [Ca²⁺] odvisne sekrecije rekombinantnih terapevtskih proteinov.

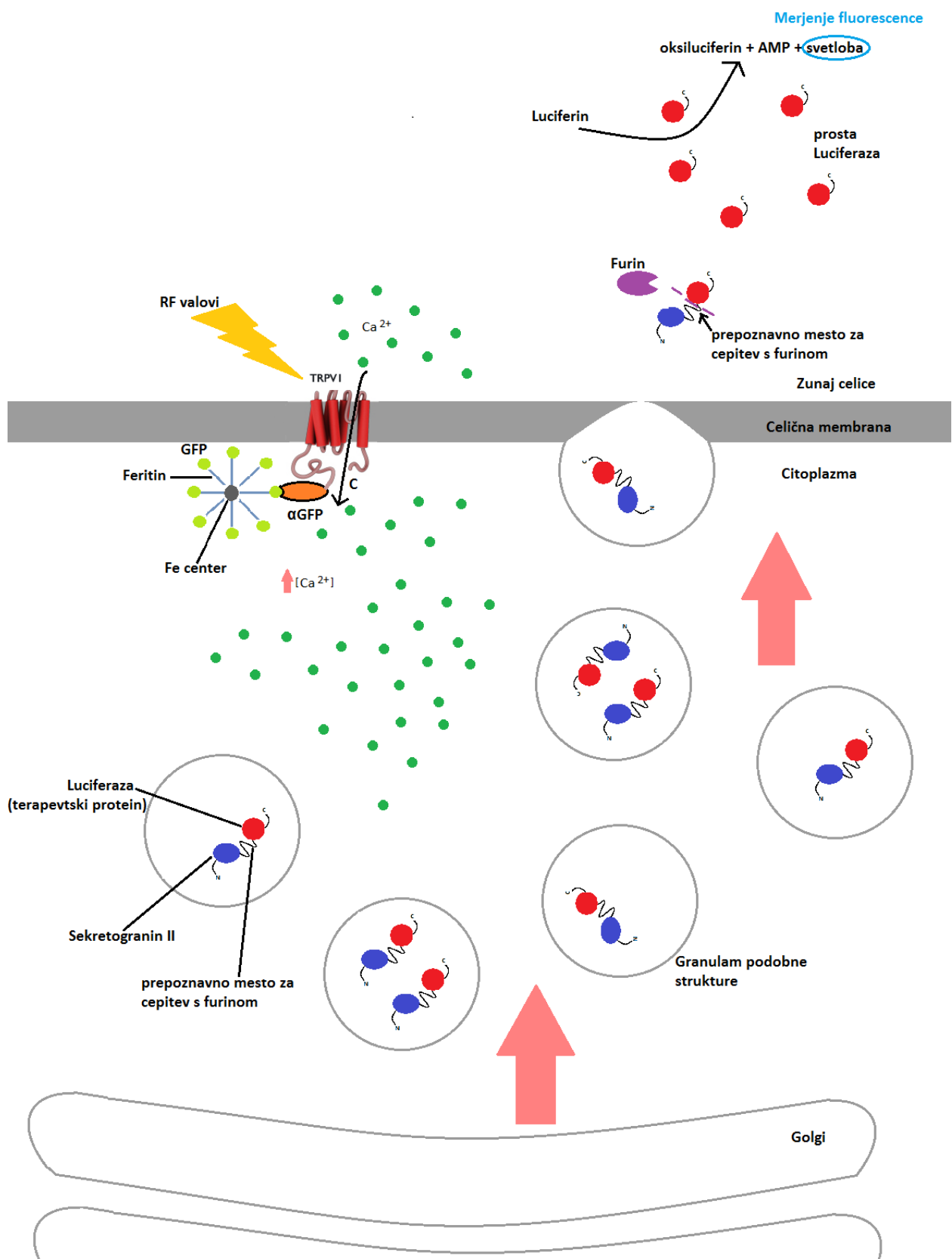
Sekretogranin II (SgII, ang.: secretogranin II) je sekretorni protein, ki sodeluje v sortiranju proteinov v sekretorne granule.¹ Zlivaje membrane granul s plazmalemo in tako sekrecija molekul znotraj granul je regulirana z zvišano koncentracijo Ca²⁺ v citoplazmi. Naredili bi fuzijo SgII na luciferazo iz kresničke (oz. terapevtski protein) prek linkerja s prepoznavnim mestom za cepitev s furinom. Konstrukt bi se konstitutivno sintetiziral in kopičil v granulam podobnih strukturah do zvišanja intracelularne koncentracije Ca²⁺. Zunaj celice bi ločili luciferazo od konstrukta s furinom, ki bi cepil povezovalni peptid na C koncu.

Za uravnavanje koncentracije Ca²⁺ v citoplazmi lahko uporabimo sistem temperaturno odvisnega membranskega kanalčka za Ca²⁺ (TRPV 1), ki se prek protitelesa za GFP (α GFP) veže na GFP v konstrukt GFP/feritin. Železovo jedro v feritinu služi kot znotrajcelično skladišče železa.²

Če na celice, ki imajo sistem GFP/feritin - α GFP/TRPV 1 obsevamo z ultrazvokom (radio frekvenčni valovi) se železovo jedro v feritinu zaradi dovedene energije začne segrevati. Proizvedena toplota odpre α GFP/TRPV 1 kanalček in Ca²⁺ zaradi koncentracijskega gradienta prehaja v celico. Povišana koncentracija Ca²⁺ v citoplazmi povzroči, da sekretorne granule potujejo proti plazmalemi in se z njo zlivajo. Tako se iz granul v medij sprostijo fuzijski protein SgII/linker/luciferaza, ki ga v mediju cepi furin. Prosta luciferaza katalizira pretvorbo luciferina do oksiluciferina, AMP in svetlobe, kar lahko kvantitativno izmerimo z merjenjem fluorescence (slika 1).

S projektom bi preverili:

- ali sortiranje v granulam podobne strukture ni ovirano s fuzijo luciferaze na SgII
- kako na sekrecijo luciferaze vpliva različna koncentracija Ca²⁺ v mediju
- kako na sekrecijo luciferaze vpliva čas obsevanja z ultrazvokom
- ali se ohrani sistem sekrecije, če luciferazo zamenjamo s terapevtskimi proteini (npr. rekombinantni inzulin)

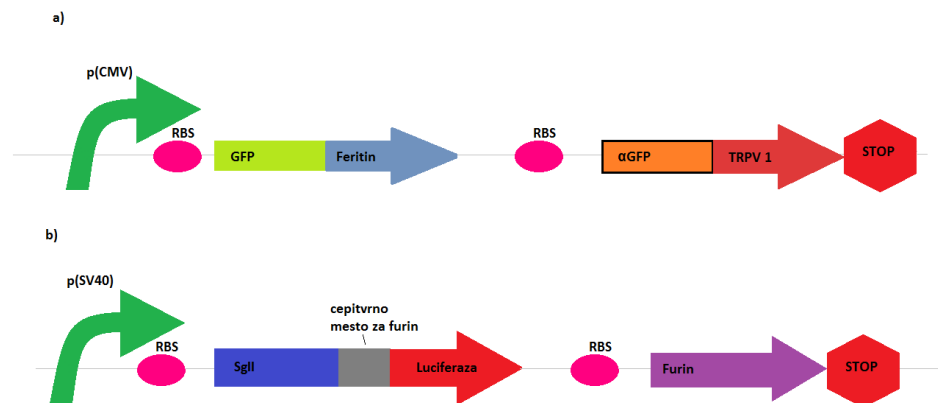


Slika 1: Prikaz delovanja predlaganega projekta.

Izvedba

Sinteza DNA in plazmidov

Preveriti moramo ali je možno pridobiti željene dele (promotorje, RBS zaporedja, cDNA proteinov, ...) iz sistema Biokock in poiskati manjkajoča DNA zaporedja. Nato je potrebno pridobljene dele sestaviti v spodnje konstrukte (slika 2) – rezanje in ligacija po sistemu biokock ali PCR reakcija z načrtanimi oligonukleotidi in sestavljanje po Gibsonu.



Slika 2: Prikaz zamišljenih DNA konstruktov. p(CMV) in p(SV40): konstitutivna promotorja za sesalske celice; RBS: mesto vezave ribosoma; GFP: zeleni fluorescirajoči protein; αGFP: protitelo proti GFP; STOP: terminator transkripcije.

Pridobljena DNA zaporedja bi predstavili v vektor za sintezno biologijo, ter z njimi transformirali bakterije za namen pomnožitve DNA. Plazmide bi nato morali sekvenirati, da se prepričamo o ustreznosti dobljenega DNA zaporedja.

Potrebno je pripraviti tudi plazmide s posameznimi deli iz sistema ter reporterskimi proteini, da se preveri ali vsak posamezen del sistema deluje pravilno.

Sesalske celice

Sesalske celice (npr. HEK) bi najprej transfecirali s plazmidom, ki imajo posamezne dele sistema z reporterskim proteinom ter tako preverili pravilnost delovanja posameznih delov v sesalskih celicah.

Za izvedbo projekta bi sesalske celice transfecirali s plazmidom, ki ima vključek na sliki 2a ter dosegli stabilno izražanje sistema membranskega kanalčka za Ca^{2+} . Nato bi celice transformirali še z drugim plazmidom, ki ima vključek na sliki 2b (lahko bi opravili tudi samo eno transfekcijo z obema plazmidoma hkrati). Celice bi gojili dalje in po določeni časovni enoti (~ 2 dni) odvzeli medij ter preverili bazalno raven sekrecije z imunološko metodo ali spektrofotometrično ob dodatku substrata, luciferina.

Alikvot celic, ki bi stabilno izražale sistem bi nato stimulirali z ultrazvokom in preverili delovanje celotnega sistema. V enakomernih časovnih razmikih bi menjali medij ter v odvzetem mediju preverili prisotnost luciferaze. Zaznavanje luciferaze v mediju lahko izvedemo imunološko (s protitelesi proti luciferazi) ali spektrofotometrično ob dodatku substrata, luciferina. Količina dobljenega produkta bi bila v tem primeru neposredno povezana s količino luciferaze v gojišču.

Če bo sistem deloval, lahko z alikvoti celic, ki stabilno izražajo sistem preverimo kako vpliva čas stimulacije z ultrazvokom (različni časi izpostavljenosti ultrazvoku) in kako različne koncentracije Ca^{2+} v mediju (EDTA, naraščajoče koncentracije Ca^{2+} v mediju) na sekrecijo luciferaze v medij. Nadalje lahko poskusimo tudi z zamenjavo luciferaze z drugim proteinom (sekretornim) in z imunološkimi metodami preverimo ali sistem omogoča regulirano sekrecijo tudi drugih (npr. terapevtskih) proteinov.

Možni problemi pri projektu

Problem lahko predstavlja fuzija luciferaze na SgII, če s tem onemogoča normalno tvorjenje sekretornim granulam podobne strukture. Kot možno rešitev lahko uporabimo drug protein (npr. interleukin 1 β) kot fuzijski partner luciferaze. Iz pregledane literature je sekrecija IL-1 β močno odvisna od koncentracije Ca²⁺ v celici,³ o fuzijah z drugimi proteini pa literature nisem zasledila. Drugi problem lahko predstavlja previsoka bazalna sekrecija fuzijskih proteinov (brez stimulacije z ultrazvokom). Rešitev tega problema bi bila zamenjava močnega promotorja p(SV40) za kakšen manj močen konstitutiven promotor ali inducibilen sesalski promotor z regulirano aktivacijo.

Prednosti predlaganega projekta

Prednost predlaganega pristopa je, da lahko z ultrazvokom aktiviramo sproščanje željenega proteina v okolico celice. V kolikor bi celice imobilizirali na nosilec, bi lahko bil ta projekt uporaben za medicinske namene, saj predstavlja sistem za enostavno dostavo terapevtskih proteinov. Ker je v celicah celoten sistem že prisoten in ob stimulaciji ni potreben prepis (transkripcija) in prevajanje (translacija) proteinov je možna uporaba v terapevtske namene, kjer je potrebna hitra in regulirana dostava rekombinantnega proteina (npr. inzulina).