

Gimnazija Vič

**Razvoj inovativnih biosenzorjev za detekcijo virusne aktivnosti z
uporabo orodij sintezne biologije**

PODROČJE: MEDICINA

Maša Bratkovič in Zoja Jesih

Gimnazija Vič

Ljubljana 2023/2024

Gimnazija Vič

**Razvoj inovativnih biosenzorjev za detekcijo virusne aktivnosti z
uporabo orodij sintezne biologije**

Maša Bratkovič

Zoja Jesih

Mentorici:

dr. Taja Železnik Ramuta, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Kemijski
inštitut

Alenka Mozer, Gimnazija Vič

Ljubljana, 2023/2024

POVZETEK

Pandemija SARS-CoV-2 je ponovno pokazala velik pomen diagnostike virusnih okužb. Trenutno uveljavljene metode za odkrivanje virusov zahtevajo veliko časa in so običajno neuspešne pri detekciji mutiranih virusov, zato biosenzorji predstavljajo alternativen pristop. Eden od naravnih sistemov za odkrivanje virusov je inflamasaom CARD8. Namen naše študije je bil razviti biosenzor za detekcijo virusov, pri čemer smo s pristopi sintezne biologije preoblikovali molekulo CARD8. Z uporabo molekularnega kloniranja, konfokalne mikroskopije in celičnih kultur smo zasnovali in preizkusili biosenzor, sestavljen iz senzorske komponente (t.j. modificiran CARD8) in encimske komponente (t.j. sistem z razcepljenim encimom). Najprej smo rekonstruirali aktivnost inflamasma CARD8 v celični liniji HEK293T, ki se pogosto uporablja pri razvoju biosenzorjev, vendar naravno ne izraža inflamasma CARD8. Transfekciji biosenzorja v celice HEK293T in aktivatorju je sledila proteolitična cepitev in oligomerizacija CARD8, kar je privedlo do rekonstrukcije razcepljenega encima, čigar delovanje nam je omogočilo merjenje aktivnosti biosenzorja. Razvili smo dva biosenzorja; v prvem primeru je bil CARD8 spojen z razcepljeno beta-laktamazo (CARD8-TEV-splitBetaLac), v drugem primeru pa z razcepljeno luciferazo (CARD8-TEV-splitLuc). Medtem ko senzor CARD8-TEV-splitBetaLac ni ustrezno zaznal aktivnosti virusne proteaze, je senzor CARD8-TEV-splitLuc uspešno zaznal delovanje proteaz HIV in TEV. Prednost biosenzorja CARD8-TEV-splitLuc je v tem, da ne zaznava specifičnega virusnega zaporedja, temveč samo aktivnost virusne proteaze, s čimer je neodvisen od virusnih mutacij. Poleg tega je biosenzor modularen, saj ga je mogoče prilagoditi za zaznavanje katerekoli virusne proteaze. Tovrstni senzorji bi se lahko uporabljali tako v diagnostiki, kot tudi pri razvoju protivirusnih zdravil, usmerjenih proti virusnim proteazam.

ABSTRACT

The importance of viral detection became obvious during the SARS-CoV-2 pandemic. The traditional methods for detecting viruses require time and can fail to detect mutated viruses. Biosensors present a way to create robust alternatives. One of the natural viral detection systems is the caspase recruitment domain family member 8 (CARD8) inflammasome. Our study aimed to develop a viral detection sensor by rewiring the CARD8 receptor using synthetic biology approaches. Using molecular cloning, confocal microscopy, and cell culture techniques, we designed and tested a biosensor comprised of the sensor component (modified CARD8) and the enzymatic component (split-protein system). First, we reconstructed the CARD8 inflammasome activity in HEK293T cells, which are often used in the development of biosensors but do not naturally express inflammasomes. Next, the sensor was transfected into the HEK293T cells. The presence of an activator led to the proteolytic cleavage, the CARD8 oligomerization and the reconstruction of the split protein, allowing us to measure its activity. For the first sensor, CARD8 was fused to split beta-lactamase (CARD8-TEV-splitBetaLac) and in the second case, CARD8 was fused to split luciferase (CARD8-TEV-splitLuc). While the CARD8-TEV-splitBetaLac did not detect viral protease activity, the CARD8-TEV-splitLuc sensor successfully detected HIV protease and TEV protease. The main advantages of this sensor are that it does not detect a specific viral sequence and is thus independent of mutations and its adaptability since it can be modified to detect any viral proteases. Developed sensors could be used for diagnostics and for the development of antiviral drugs targeting viral proteases.

Kazalo

1	UVOD	1
1.1	NAMEN IN CILJ RAZISKOVALNE NALOGE.....	1
1.2	HIPOTEZE	2
2	PREGLED LITERATURE	3
2.1	Imunski sistem	3
2.1.1	Prirojeni imunski sistem.....	3
2.1.2	Inflamasomi	4
2.2	Biosenzorji.....	8
2.2.1	Detekcija virusov	8
2.3	Sintezna biologija.....	9
2.3.1	Sistemi razcepljenih proteinov	10
2.4	MATERIALI.....	11
2.4.1	Laboratorijska oprema.....	11
2.4.2	Kemikalije.....	12
3	Zasnova senzorja in načrt eksperimentalnega dela	14
3.1	METODE	16
3.1.1	Verižna reakcija s polimerazo.....	16
3.1.2	Agarozna gelska elektroforeza.....	17
3.1.3	Izolacija in čiščenje DNK.....	18
3.1.4	Metoda izotermalnega lepljenja po Gibsonu	18
3.1.5	Transformacija kompetentne bakterije <i>Escherichia coli</i>	18
3.1.6	PCR na osnovi kolonij	19
3.1.7	Izolacija in čiščenje plazmidne DNK.....	20
3.1.8	Sesalske celične kulture	20
3.1.9	Prehodna transfekcija plazmidne DNK v sesalske celice	21
3.1.10	Konfokalna mikroskopija	22
3.1.11	Luciferazni test.....	22
3.1.12	Beta-laktamazni test	23
3.1.13	Statistična analiza	23
4	REZULTATI	24
4.1	Inflamasom CARD8 smo uspešno rekonstruirali v celicah HEK293T.....	24

4.2	Dizajn in priprava plazmidov, ki kodirajo senzorje virusne aktivnosti na osnovi CARD8	25
4.3	Aktivacija senzorja CARD8-TEV-splitLuc s proteazama TEV ali HIV sproži piroptozo	28
4.4	Senzor CARD8-TEV-splitBetaLac ne zaznava virusne aktivnosti	29
4.5	Senzor CARD8-TEV-splitLuc uspešno zazna virusno aktivnost	31
5	DISKUSIJA	34
5.1	Aktivacijo inflamasma CARD8 lahko vzpostavimo v celicah HEK293T	34
5.2	Vzpostavitev senzorjev na osnovi CARD8 za detekcijo virusne aktivnosti	35
5.2.1	Zmanjšanje signala senzorja CARD8-TEV-splitBetaLac v prisotnosti proteaze TEV	35
5.2.2	Senzor CARD8-TEV-splitLuc uspešno zaznava aktivnost proteaz TEV in HIV	36
5.2.3	Prihodnji razvoj in potencialna uporaba senzorjev na osnovi CARD8	37
6	ZAHVALA	39
7	VIRI	39

Kazalo slik

Slika 1.	Maša in Zoja pri raziskovalnem delu	1
Slika 2.	Nastanek inflamasomov in sprožitev piroptoze.	6
Slika 3:	Aktivacija inflamasma CARD8.	8
Slika 4.	Sistem razcepljene luciferaze.	10
Slika 5:	Aktivacija senzorja na osnovi CARD8.	14
Slika 6:	Potek dela.	15
Slika 7.	Inflamasma CARD8 je mogoče rekonstruirati v celicah HEK293T.	25
Slika 8.	Dizajn in shema senzorjev CARD8	26
Slika 9:	Priprava konstrukta CARD8-TEV.	27
Slika 10.	Proteolitična cepitev senzorja CARD8-TEV-splitLuc s proteazo HIV ali TEV povzroči piroptozo.	29
Slika 11:	Shema dizajna CARD8-TEV-splitBetaLac in zasnove eksperimenta.	30
Slika 12.	Senzor CARD8-TEV-splitBetaLac ne zazna virusne aktivnosti.	31
Slika 13:	Shema dizajna CARD8-TEV-splitLuc in zasnove eksperimenta.	32
Slika 14.	Senzor CARD8-TEV-splitLuc je senzor aktivnosti virusne proteaze.	33

Kazalo tabel

Tabela 1. Seznam uporabljene laboratorijske opreme.	11
Tabela 2. Seznam uporabljenih kemikalij.....	12
Tabela 3. Seznam uporabljenih kompletov reagentov.....	12
Tabela 4. Seznam uporabljenih raztopin in pufrov.....	13
Tabela 5. Seznam uporabljenih celičnih linij.....	13
Tabela 6. Seznam uporabljenih bakterijskih kultur.	13
Tabela 7. Seznam uporabljenih gojišč za gojenje sesalskih celičnih linij.	13
Tabela 8. Seznam uporabljenih gojišč za gojenje bakterijskih kultur.	13
Tabela 9. Seznam uporabljenih vektorjev ali vključkov.....	13
Tabela 10. Seznam oligonukleotidnih začetnikov za pripravo senzorjev na osnovi CARD8.	16
Tabela 11. Reakcijska mešanica za PCR.	17
Tabela 12. Program za reakcijo PCR.....	17
Tabela 13. Reakcijska mešanica za PCR.	19
Tabela 14. Program za reakcijo PCR na osnovi kolonij.	19
Tabela 15. Količine plazmidov, ki smo jih uporabili pri transfekciji celic HEK293T.	21

Seznam kratic

ASC	Adapterski protein
bp	Bazni par
CARD8-splitLucN	Senzor CARD8 z N-končnim delom razcepljene luciferaze
CARD8-splitLucC	Senzor CARD8 s C-končnim delom razcepljene luciferaze
CARD8-splitBetaLacN	Senzor CARD8 z N-končnim delom razcepljene beta-laktamaze
CARD8-splitBetaLacC	Senzor CARD8 s C-končnim delom razcepljene beta-laktamaze
DAMP	S poškodbami povezani molekularski vzorci (<i>angl. danger-associated molecular patterns, DAMP</i>)
DMEM	Hranilni medij (<i>angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DPP8	Didpeptidil peptidaza 8
ELISA	Encimski imunski test
FBS	Fetalni goveji serum (<i>angl. fetal bovine serum</i>)
IL-1 β	Interlevkin 1 β
LB	Tekoče gojišče Luria Bertani

PAMP	S patogenimi mikroorganizmi povezani molekularni vzorci (angl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP)
PBS	Fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate-buffered saline)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PRR	Receptorji, ki prepoznavajo vzorce (angl. pattern recognition receptors)
SEM	Standardna napaka (angl. standard error of the mean)
TEV	Virus tobačnega jedkanja (angl. tobacco etch virus)

1 UVOD

Sva Maša Bratkovič in Zoja Jesih ter trenutno obiskujeva Gimnazijo Vič, na kateri dijake povezuje ljubezen do znanosti in tehnologije. Večkrat sva se udeleževali dnevov odprtih vrat in ko sva dobili izjemno priložnost, da sodelujeva pri raziskovalnem delu, ki poteka na Odseku za sintezno biologijo in imunologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, sva bili presrečni. S pomočjo mentoric prof. Alenke Mozer in dr. Taje Železnik Ramuta sva delali na lastnem raziskovalnem projektu, katerega cilj je bil razviti virusni senzor na podlagi molekul človeške prirojene imunosti (Slika 1).



Slika 1. Maša in Zoja pri raziskovalnem delu.

1.1 NAMEN IN CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Bolezni, ki jih povzročajo virusne okužbe, predstavljajo veliko zdravstveno breme, zato je hitro zaznavanje virusnih okužb ključnega pomena za dobrobit živih bitij. Večina trenutnih diagnostičnih metod sloni na zaznavanju posameznih komponent virusov (bodisi nukleinskih kislin ali proteinov). Virusi pogosto spreminjajo svoj genomski zapis (mutirajo), zato se lahko zgodi, da mutiranega virusa uveljavljena metoda ne zazna. V raziskovalni nalogi smo želeli vzpostaviti sistem, ki bi bil neodvisen od zaporedja virusnih komponent, ampak bi temeljil na encimski aktivnosti encima, ki ga virus nujno potrebuje za namnoževanje.

Zamisel našega projekta je bila, da uporabimo senzor CARD8, ki predstavlja del prirojene imunosti, ga preoblikujemo in uporabimo pri pripravi novih senzorjev, s katerimi bi lahko zaznali aktivnost določenega virusa ali skupine virusov ali tudi drugih mikrobov. Virusne proteaze so ključne za namnoževanje virusov, zato se tudi v primeru mutacij aktivnost virusnih proteaz ohrani.

Posledično je senzor, ki zazna aktivnost virusnih proteaz, odporen proti mutacijam. Z uporabo metod sintezne biologije smo inflamason CARD8 preoblikovali tako, da ne povzroča celične smrti, temveč omogoča zaznavo virusne aktivnosti, pri čemer pride do nastanka merljivega signala. Razvili smo senzor, ki je bil sestavljen iz dveh modulov. Prvi modul je preoblikovani CARD8, ki služi kot senzor aktivnosti virusnih proteaz. Drugi modul predstavlja encimska komponenta, kar so bili v našem primeru razcepljeni encimi. Ti se po prejemu signala (v našem primeru aktivnosti virusne proteaze) sestavijo v funkcionalne encime, zmožne presnove izbranih substratov in njihovo aktivnost lahko na različne načine izmerimo. Z uporabo sistemov z razcepljenimi proteini bi lahko aktivnost virusne proteaze merili z zaznavanjem emisije svetlobe (za kar se uporabljajo posebne naprave) ali z vizualnim zaznavanjem (ob presnovi substrata pride do spremembe barve). Slednje bi bilo še posebej priročno, saj za odčitavanje rezultatov ne bi potrebovali posebnih naprav ali znanja. Delo z virusi je zelo nevarno in se lahko izvaja le v posebnih laboratorijih, zato smo sistem vzpostavili z uporabo virusnih proteaz, ki na varen način simulirajo virusno aktivnost. Če povzamemo, glavni cilj tega projekta je bil razviti senzor virusne aktivnosti s preoblikovanjem signalizacije inflamasona CARD8.

1.2 HIPOTEZE

Namen projekta je bil s preoblikovanjem signalnih poti inflamasona CARD8 razviti senzor, ki bi zaznal virusno aktivnost in podal merljiv signal. Pri delu smo si zastavili sledeče hipoteze:

1. Aktivnost inflamasona CARD8 je mogoče rekonstruirati v celicah HEK293T.
2. Komponente inflamasona CARD8 je mogoče preoblikovati v senzorsko komponento senzorja virusne aktivnosti.
3. Sistemi razcepljenih encimov so primerni za oblikovanje encimske komponente senzorja virusne aktivnosti, ki poda merljiv signal.
4. Novi senzor virusne aktivnosti se bo aktiviral ob cepitvi z virusnimi proteazami.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Imunski sistem

Z izrazom imunski sistem označujemo skupino celic, procesov in snovi, ki jih proizvaja naše telo, da bi pomagalo zaščititi vse pomembne organske sisteme. Ohranjanje homeostaze (t.j. stanje organizma, v katerem fiziološki procesi tečejo optimalno) ob spremembah v notranjem in zunanjem okolju, kot so spremembe v oskrbi s hranili in vodo, fizičnih obremenitvah, temperaturnih spremembah, fiziološkem stresu, okužbah in malignih obolenjih, predstavlja glavni izziv za žive organizme. Skozi milijarde let evolucije so bile izbrane tiste oblike življenja in biološki procesi, ki se s temi izzivi spopadajo na najuspešnejši način. Eden od izzivov, s katerim se morajo spopasti vsi organizmi, je odstranjevanje mikroorganizmov in spremenjenih ali poškodovanih celic in tkiva. Idealen imunski odziv bi odpravil potencialno grožnjo in ponovno vzpostavil homeostazo, brez da bi povzročil pretirano škodo zdravim celicam in tkivom, vendar so imunski odzivi lahko tudi pretirani in povzročijo poškodbo tkiva. Kadar je korist odstranitve mikroorganizma in spremenjenih ali poškodovanih celic večja od tveganja, povezanega s poškodbo tkiva in potrebe po regeneraciji, so takšni odzivi evolucijsko ugodni. Idealen imunski odziv organizmu omogoča, da obseg in trajanje imunskega odziva modulira glede na naravo grožnje, ki jo povzroča okužba ali sprememba v tkivu (Paludan et al., 2021).

Razlikujemo med prirojenim imunskim sistemom, s katerim se rodimo, in pridobljenim imunskim sistemom, ki se razvije z izpostavljenostjo patogenim organizmom (Marshall et al., 2018). Glavna razlika med njima je sposobnost "spominjanja" ali prepoznavanja patogenov, s katerimi je imunski sistem predhodno prišel v stik, kar je lastnost le pridobljenega imunskega sistema. Imunska sistema se ne izključujeta, temveč delujeta drug ob drugem, pri čemer se prirojeni imunski sistem odzove prvi, je manj specifičen in daje zagon pridobljenemu sistemu, ki je bolj specifičen in do njegove aktivacije pride pozneje, če patogen uspešno preide prve obrambne linije (Chaplin, 2010).

2.1.1 Prirojeni imunski sistem

Prirojeni imunski sistem je prisoten v vseh večceličnih organizmih in služi kot prvi mehanizem zaščite gostitelja pred neznanimi mikroorganizmi. Glavni funkciji prirojene imunosti sta rekrutiranje imunskih celic na območje okužbe in sprožitev vnetja s proizvodnjem citokinov in

kemokinov, ki so majhni proteini, vpleteni v medcelično komunikacijo in rekrutiranje različnih imunskih celic. Zlasti citokini mobilizirajo številne obrambne mehanizme po vsem telesu, aktivirajo pa tudi lokalne celične odzive na okužbe ali poškodbe (Kubelkova & Macela, 2019; Marshall et al., 2018).

Razlikujemo več obrambnih pregrad, ki sestavljajo našo prirojeno imunost. Te so fiziološke (nizek pH, kemični mediatorji in telesna temperatura), anatomske (npr. koža, sluznice), celične (fagocitne celice) in vnetni dejavniki. Celična komponenta prirojenega imunskega sistema je zelo pomembna, in sicer gre za celice, ki se nadalje diferencirajo v makrofage (fagocitne celice), dendritične celice (celice, ki predstavljajo antigene), naravne celice ubijalke in epiteljske celice (predstavljajo pregrado). Zadnje pravzaprav uradno ne veljajo za del profesionalnega imunskega sistema, vendar zaradi vzpostavitve pregrade med organizmom in mikroorganizmi igrajo pomembno zaščitno vlogo (Kubelkova & Macela, 2019; Marshall et al., 2018).

Ključno vlogo pri aktivaciji prirojene imunosti igrajo receptorji, ki prepoznavajo vzorce (receptorji PRR- *angl. pattern recognition receptors*). Te receptorje aktivirajo raznoliki s patogenimi mikroorganizmi povezani molekularni vzorci (*angl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) ali s poškodbami povezani molekularni vzorci (*angl. danger-associated molecular patterns, DAMP*). Poznamo več družin receptorjev PRR. Najbolj raziskani so Tollu podobni receptorji, ki se nahajajo na plazemski membrani ali pa na endosomih in ob aktivaciji sprožijo prepisovanje in sintezo številnih dejavnikov vnetja. Nekateri receptorji pa se nahajajo v citosolu. To so NOD-u podobni receptorji (receptorji NLR), AIM2-podobni receptorji (ALR) ter RIG-I podobni receptorji (RLR). Ti receptorji so pomembni, saj zaznavajo prisotnost PAMP in DAMP v celici in tudi sprožijo močne vnetne odzive (Brubaker et al., 2015).

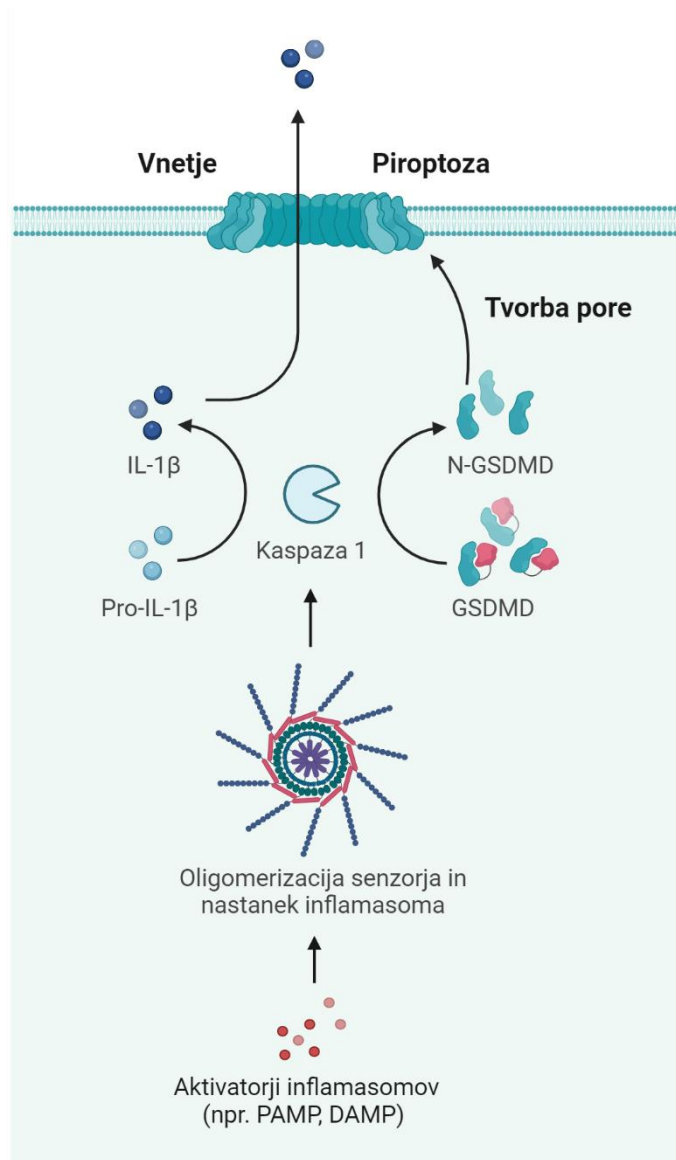
2.1.2 Inflamasomi

Izraz inflamasom so leta 2002 uvedli Tschopp in sodelavci (Martinon et al., 2002). Z njim so opisali visokomolekularni kompleks v citosolu stimuliranih imunskih celic, ki medira aktivacijo vnetnih kaspaz. Inflamasom je komponenta prirojenega imunskega sistema, ki spodbuja vnetje in sproži vnetno obliko programirane celične smrti, piroptozo. Aktivacija inflamasoma sledi kot odgovor na zaznavanje PAMP ali DAMP s strani izbranih receptorjev PRR (Li et al., 2021).

Inflamasomi se večinoma nahajajo v izbranih imunskih celicah, določene inflamosome pa so zaznali tudi v anatomskih pregradah, npr. sluznici prebavil (Winsor et al., 2019).

Inflamasom sestavljajo receptor PRR, prokaspaza 1 in pri večini inflamatomov tudi adapterski protein ASC. PAMP ali DAMP posredno ali neposredno povzročijo oligomerizacijo senzorja, kar sproži sestavljanje inflamasoma. Nato pride do pretvorbe neaktivne prokaspaze 1 v katalitično aktivno kaspazo 1, ki sproži zorenje in sproščanje interleukina-1 β (IL-1 β) in IL-18. Drugi substrat kaspaze 1 je gasdermin D, katerega cepitev povzroči sprostitvev njegove N-končne domene, ki v celični plazmalemi tvori pore, s čimer povzroči piroptozo (Slika 2) (Broz & Dixit, 2016; Hafner-Bratkovič, 2023).

Motnje v aktivaciji inflamatomov so lahko povezane z razvojem raka, avtoimunskih, presnovnih in nevrodegenerativnih bolezni. Strog nadzor nad sestavo in signalizacijo inflamatomov je izrednega pomena, da lahko imunski sistem sproži protimikrobne in vnetne odzive, ne da bi istočasno poškodoval tkivo (Broz & Dixit, 2016).

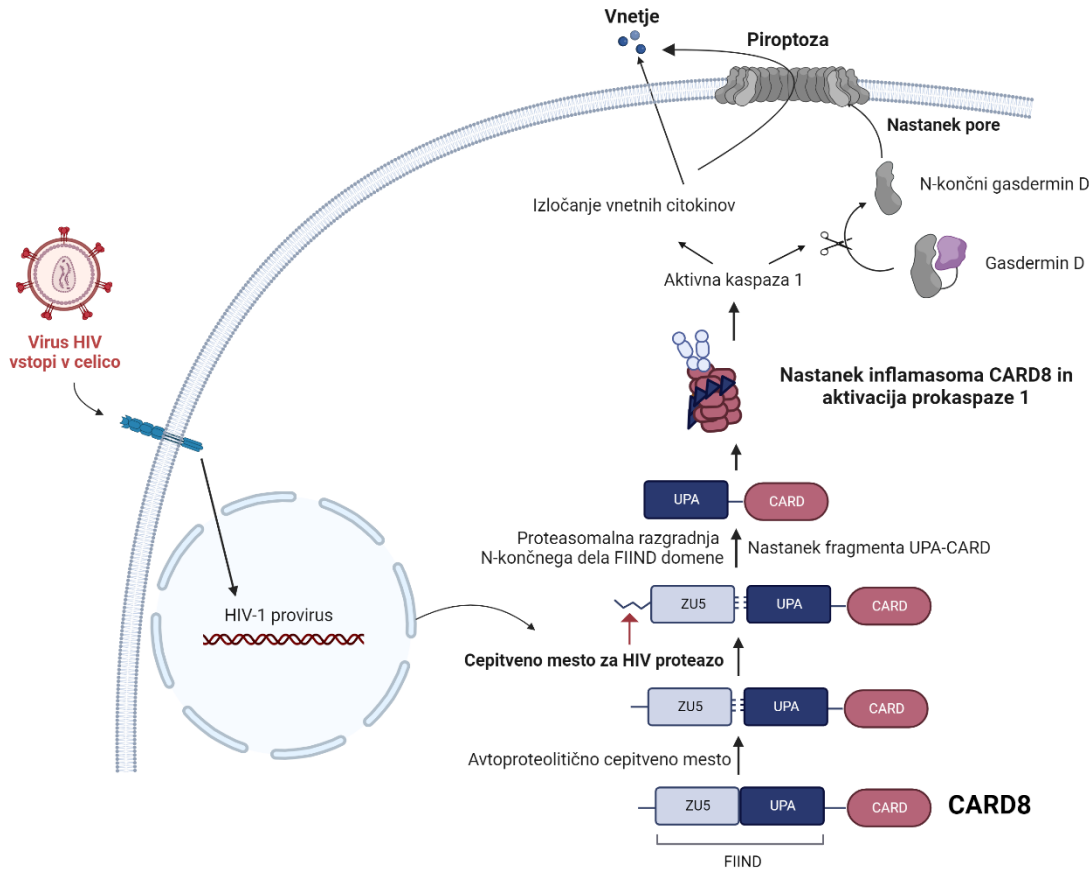


Slika 2. Nastanek inflammasomov in sprožitev piroptoze. PAMP ali DAMP povzročijo oligomerizacijo sensorja in sestavljanje inflammasoma. Temu sledi aktivacija kaspaze 1, ki pretvori pro-IL-1 β v aktivno obliko in cepi gasdermin D, katerega N-končna domena tvori pore v plazmalemi, kar vodi v celično smrt.

2.1.2.1 Inflamasom CARD8

V tem projektu smo za razvoj senzorja uporabili komponente inflamasoma CARD8, ki je zaradi manjše velikosti senzorja CARD8 ter dejstva, da za tvorbo inflamasoma ne potrebuje adapterja ASC, ampak lahko veže prokaspazo 1 direktno, najprimernejši za manipulacijo z metodami sintezne biologije. Senzor CARD8 je sestavljen iz domene FIIND (ZU5-UPA), ki vsebuje labilno vez med obema poddomenama, in domene CARD. Ob cepitvi N-končne domene CARD8 s proteazo virusa HIV pride do proteasomske razgradnje N-končnega fragmenta in hkrati do tvorbe UPA-CARD filamentov, ki tvorijo inflamasom in rekrutirajo prokaspazo 1 (Slika 3). Za razliko od ostalih inflamasomov CARD8 za aktivacijo ne potrebuje adaptorskega proteina (ASC). Aktivni inflamasom CARD8 omogoči pretvorbo prokaspaze 1 v aktivno kaspazo 1, ki cepi gasdermin D. N-konec gasdermina D potem tvori pore v celični membrani, ki omogočijo sproščanje interleukina 1β in nizko molekularne celične vsebine v zunajcelični prostor ter povzročijo vnetje in celično smrt, imenovano piroptoza (Slika 3).

Poleg proteaze virusa HIV lahko sprožijo nastanek inflamasoma CARD8 tudi zaviralci serinskih dipeptidaz DPP8 in DPP9, kot je npr. majhna molekula Val-boroPro (Johnson et al., 2018). Serinske dipeptidaze DPP8 in DPP9 z vezavo na segment UPA-CARD preprečijo tvorbo filamentov UPA-CARD in neželjeno aktivacijo inflamasoma CARD8, Val-boroPro pa prepreči tvorbo kompleksa DPP8/9 -CARD8 in tako sproži tvorbo filamentov UPA-CARD.



Slika 3: Aktivacija inflammasoma CARD8.

2.2 Biosenzorji

Biosenzorji so naprave (najpogosteje encimi), ki se uporabljajo za ugotavljanje prisotnosti določenih molekul v živem organizmu. Predstavljajo zelo obetavno alternativo tradicionalnim diagnostičnim testom, saj veljajo za občutljivo, poceni in modularno metodo. Biosenzorji so sestavljeni iz bioloških ali kemičnih receptorjev, ki se odzivajo na zelo specifične snovi, znane tudi kot ciljni analiti, in pretvornika, ki biokemični odziv na omenjene molekule pretvori v signal, ki ga lahko meri detektorski modul. Te signale je nato mogoče z ustrežno interpretacijo uporabiti za postavitev medicinske diagnoze (Mehrotra, 2016; Ozer et al., 2020; Ribeiro et al., 2020).

2.2.1 Detekcija virusov

Mikrobne okužbe lahko povzročijo razvoj resnih nalezljivih boleznih in smrt, zato jih je pomembno pravočasno diagnosticirati, da se prepreči nadaljnje širjenje bolezni. Virusne okužbe lahko

diagnosticiramo neposredno ali posredno. Metode za neposredno prepoznavanje okužbe vključujejo zaznavanje virusnih nukleinskih kislin, vizualizacijo virusov in odkrivanje virusnih antigenov (Ozer et al., 2020). Najpogosteje uporabljene metode za odkrivanje virusov vključujejo verižno reakcijo s polimerazo (PCR), gojenje virusov in titracija ali encimski imunski test (ELISA), vendar so te metode običajno precej zamudne in zahtevajo posebne pogoje ter opremo (Bhalla et al., 2016; Kiselev et al., 2020; Ozer et al., 2020), predvsem pa večina od njih zazna zelo specifično zaporedje virusnih nukleinskih kislin ali proteinov, zato lahko ne zaznajo mutiranega virusa. Tekom pandemije bolezni COVID19 so za množično in domačo uporabo razvili hitre antigenske teste, ki temeljijo na zaznavanju virusnih proteinov, zato je poleg slabše občutljivosti glavna pomanjkljivost teh testov, da morda ne bi zaznali mutiranega virusa.

Kljub velikemu napredku v diagnostiki virusnih okužb je zaradi pojava novih virusov in njihovega hitrega spreminjanja potrebno razvijati drugačne metode detekcije.

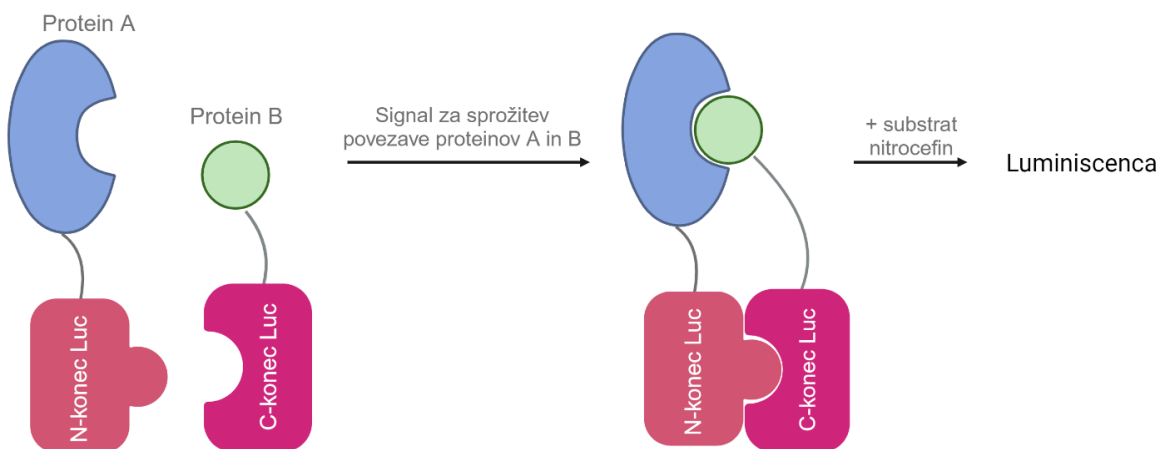
2.3 Sintezna biologija

Sintezna biologija je interdisciplinarno področje, v sklopu katerega poteka snovanje umetnih bioloških sistemov, ki posnemajo izbrane celične lastnosti in procese ali razvijajo povsem nove funkcionalnosti, ki jih v naravi ni mogoče najti. Osnovo predstavljajo molekule, ki v naravi opravljajo specifične naloge, kot so uravnavanje prepisovanja genov in prevajanja, vezava majhnih molekul, vezava proteinskih domen in spreminjanje genskega materiala. Večina molekul, uporabljenih v sintezni biologiji, izvira iz narave in raziskovalci te komponente uporabijo za preoblikovanje in razvoj novih aplikacij (El Karoui et al., 2019).

Prva dokumentirana uporaba izraza "sintezna biologija" v znanstveni literaturi sega v leto 1960 in se nanaša na opis gensko spremenjenih bakterij. Z napredkom znanosti in tehnologije sta se obseg in nabor bioloških ter kemijskih orodij dopolnjevala s različnimi inženirskimi pristopi. Raziskovalci so molekule, pripravljene z metodami sintezne biologije, pričeli vnašati v žive sisteme z namenom njihovega raziskovanja, spreminjanja, preoblikovanja ali nadzora. Klasični biološki pristop analiziranja naravnih procesov z redukcijskim pristopom in poenostavljanjem se je dopolnil z inženirsko ideologijo gradnje in kombiniranja. Skupaj so ti napredki pripeljali do večplastnega področja sintezne biologije, kot ga poznamo danes (Hirschi et al., 2022).

2.3.1 Sistemi razcepljenih proteinov

Sistemi razcepljenih proteinov nam omogočajo nadzor nad procesi, ki potekajo v celici. Sistem je sestavljen tako, da je protein razcepljen na dva dela, nato pa se vsak fragment združi s partnersko domeno - protein lahko ponovno deluje, ko je rekonstruiran, kar se zgodi le, če se obe partnerski domeni medsebojno povežeta. Ker se ti sistemi lahko uporabljajo za nadzor procesov, kot so fluorescenca, bioluminiscenca in transkripcija (Dolberg et al., 2021), smo se odločili, da enega od teh sistemov uporabimo za ugotavljanje prisotnosti virusne aktivnosti v celicah HEK293T. Eden od dveh sistemov razcepljenih proteinov, ki smo ju uporabili, je bila razcepljena luciferaza (Slika 4), ki se ob interakciji obeh razcepljenih proteinov rekonstruira, kar zaznamo kot luminiscenco ob presnovi substrata. Po drugi strani ločena razcepljena proteina (N-končna in C-končna domena) sama po sebi nista zmožna presnove substrata in zato luminiscence ne zaznamo (Deng et al., 2011). V drugem primeru smo uporabili razcepljeno beta-laktamazo, ki je po rekonstrukciji lahko presnavljala substrat nitrocefim, kar je bilo razvidno iz spremembe barve substrata (Galarneau et al., 2002).



Slika 4. Sistem razcepljene luciferaze. Ločeni razcepljeni podenoti luciferaze (N-konec Luc, C-konec Luc) sami po sebi nista aktivni in nista zmožni presnove substrata. Ko se sproži ustrezen signal za povezavo proteinov A in B, pride do rekonstrukcije razcepljene luciferaze v delujoč encim, ki uspešno presnavlja substrat, kar zaznamo kot luminiscenco.

METODE IN MATERIALI

2.4 MATERIALI

2.4.1 Laboratorijska oprema

Tabela 1. Seznam uporabljene laboratorijske opreme.

Oprema	Proizvajalec
UV/VIS spektrofotometer NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific
Bela mikrotitrna plošča s prosojnim dnom s 96 vdolbinicami	Corning, TPP
Mikrovalovna pečica	Gorenje
CO ₂ inkubator za celične kulture	Binder
Luna-II Automated Cell Counter	Logos
Avtomatske pipete, multikanalne avtomatske pipete, centrifuga MiniSpin plus in serija 5415R, ThermoMixer C, mikrocentrifugirke, pipetni nastavki	Eppendorf
sterilne serološke pipete (2 ml, 5 mL, 10 mL, 25 ml)	Falcon
Centro LB 963 čitalec mikroplošč	Berthold Technologies
Konfokalni mikroskop LS5	Leica
Invertni svetlobni mikroskop DM IL LED	Leica
Laminarij	Iskra Pio
Aparat za pipetiranje	Brand
Sistem za agarozno gelsko elektroforezo	BioRad
Naprava za kapilarno elektroforezo	Qiagen
Vibracijski stresalnik	IKA
Ciklični termostat Veriti 96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
Transiluminator TI 3	Biometra
Banjice za multikanalno pipeto	Corning
2 mL pipete za sesanje	Greiner
Hlajena centrifuga Universal 320 R	Hettich
Ploščica za mikroskopiranje z 8 vdolbinicami s plastičnim dnom	Ibidi

Mikrocentrifugirke (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL), sterilne in nesterilne centrifugirke (15 mL, 50 mL), nastavki za avtomatske pipete, 11 mL centrifugirke z okroglim dnom	Sarstedt
Sterilne centrifugirke (15 ml, 50 ml), krioviale, flaške za gojenje celičnih kultur 75 cm ²	TPP

2.4.2 Kemikalije

Tabela 2. Seznam uporabljenih kemikalij.

Kemikalija	Proizvajalec
Polimeraza DNK repliQa HiFi	Quantabio
6X nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	New England BioLabs
Hoechst 33342	Cell signaling technology
D-Luciferin	Perkin-Elmer
ATP, DTT, koencim A, valboro-pro, nitrocefín, etidijev bromid, ampicilin, tripsin	Sigma-Aldrich
barvilo tripan modro, reagent Lipofectamine 2000	Invitrogen
Etanol Stella	ECP
Gibson Assembly mastermix	NEB
Agarozna	Gold Biotechnology
5X pasivni lizirni pufer	Biotium
FBS, gojišči DMEM in Opti-MEM	Gibco

Tabela 3. Seznam uporabljenih kompletov reagentov.

Ime kompleta reagentov	Proizvajalec
GeneJET Plasmid MiniPrep Kit	Thermo Fisher Scientific
VWR peqGOLD Gel Extraction Kit	VWR

Tabela 4. Seznam uporabljenih raztopin in pufrov.

Raztopina/pufer	Sestava
10 x PBS	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH=7,4
Kresničkin luciferazni pufer	4 mM HEPES, 1,6 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 40 μM EGTA, 2 mM NaF, 20 mM DTT, 0,25 mM CoA, 0,50 mM ATP, 0,42 mM luciferin, pH 7,8

Tabela 5. Seznam uporabljenih celičnih linij.

Celična linija	Opis	Proizvajalec
HEK293T	trajna celična kultura človeških embrionalnih ledvičnih celic	American Type Culture Collection (ATCC)

Tabela 6. Seznam uporabljenih bakterijskih kultur.

Bakterijska kultura	Genotip
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

Tabela 7. Seznam uporabljenih gojišč za gojenje sesalskih celičnih linij.

Gojišče	Uporaba
Optimem	Priprava transfekcijskih mešanic
DMEM z 10% FBS	Gojenje HEK293T

Tabela 8. Seznam uporabljenih gojišč za gojenje bakterijskih kultur.

Gojišče	Sestava
Tekoče gojišče Luria-Bertani (LB)	10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L kvasni ekstrakt

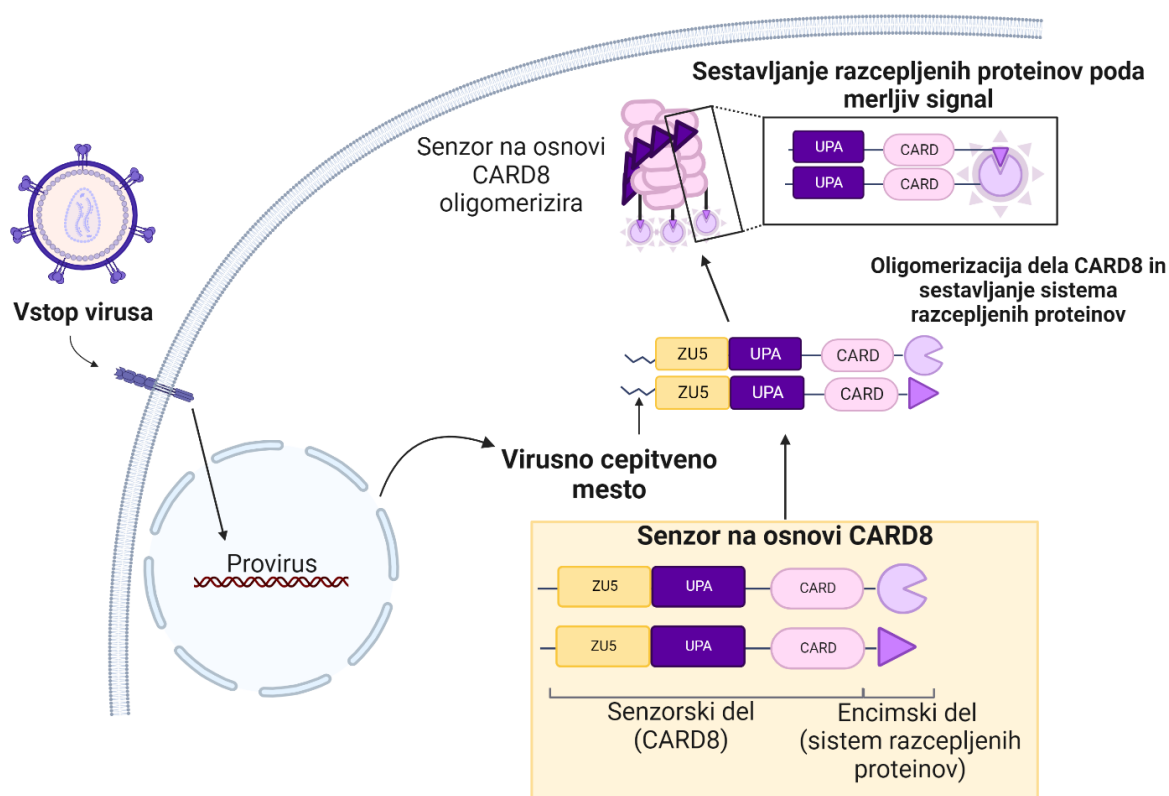
Tabela 9. Seznam uporabljenih vektorjev ali vključkov.

Vektor/vključek	Proizvajalec/vir
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3.1 CARD8-TEV-GFP-FLAG	Darilo Daniela Bachovchina Addgene (#169991)

pcDNA 3 HIV proteaza	Kemijski inštitut
pcDNA 3 TEV proteaza	Kemijski inštitut
pCI Kaspaza-1	Darilo Kate Fitzgerald Addgene (#41552)
pcDNA3 Gasdermin D	Kemijski inštitut

3 Zasnova senzorja in načrt eksperimentalnega dela

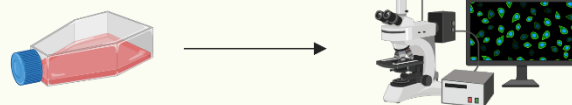
Želeli smo zasnovati senzor virusne (proteazne) aktivnosti, ki bo sestavljen iz senzornega dela (t.j. CARD8) in encimskega dela (t.j. sistem cepljenih proteinov). Cepitev N-končnega dela CARD8 z virusno proteazo bo vodila v oligomerizacijo fragmenta UPA-CARD, kar omogoči, da razcepljeni encimi tvorijo funkcionalen encim, ki potem lahko presnavlja substrat. S presnovo substrata pride do sproščanja svetlobe (luminescence) ali spremembe barve substrata, kar predstavlja merljiv signal (Slika 5).



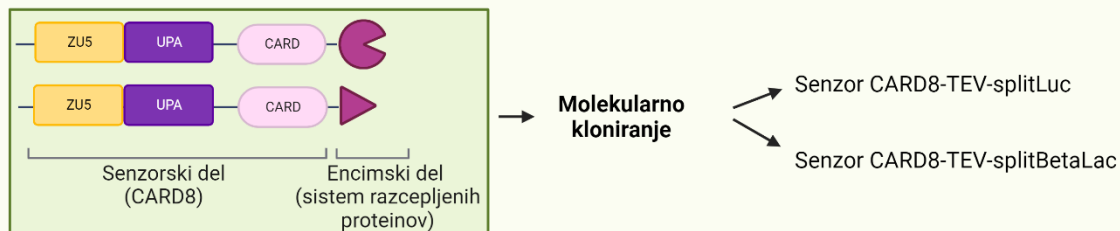
Slika 5: Aktivacija senzorja na osnovi CARD8.

Za pripravo senzorjev virusne aktivnosti smo najprej z uporabo programske opreme Benchling zasnovali zaporedja vseh konstruktov, ki bodo sestavljali senzorce. Nato smo za pripravo konstruktov uporabili različne tehnike tehnologije rekombinantne DNK. Prvi konstrukt, ki smo ga pripravili, je bil CARD8 z vnesenim mestom za cepitev s proteazo TEV (CARD8-TEV). V tem konstruktumu smo ohranili tudi mesto za cepitev s proteazo HIV. Na podlagi tega konstrukta smo pripravili senzorce. Senzorji z razcepljeno beta-laktamazo/luciferazo so sestavljeni iz dveh konstruktov CARD8-TEV, od katerih vsak vsebuje eno od razcepljenih domen beta-laktamaze/luciferaze (Sliki 5 in 6). V prvi fazi naloge smo preverili, ali se je možno aktivnost inflamasma CARD8 vzpostaviti v celicah HEK293T, v drugi fazi smo razvijali dva senzorca na osnovi CARD8 in v tretji fazi smo testirali delovanje le teh v celicah HEK293T (Slika 6).

1. Vzpostavitev inflamasma CARD8 v celicah HEK293T



2. Razvoj senzorca na osnovi CARD8

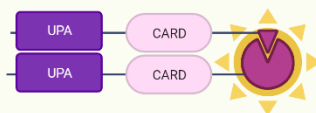


3. Preverjanje delovanja CARD8 senzorca v celicah HEK293

Delo s celičnimi kulturami in transfekcija



Aktivacija senzorca s proteolitično cepitvijo



Analiza

CARD8-TEV-splitLuc senzor:
Merjenje luciferazne aktivnosti s čitalcem mikrotitrskih plošč

CARD8-TEV-splitBetaLac senzor:
Merjenje betalaktamazne aktivnosti s čitalcem mikrotitrskih plošč

Slika 6: Potek dela.

3.1 METODE

3.1.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je molekularna tehnika in vitro (reakcija poteka v epruveti in ne v živem organizmu), ki se uporablja za pomnoževanje odsekov DNK. Odsek je določen s smernim in protismernim začetnim oligonukleotidom, ki sta komplementarna izbranim odsekom DNK. Za načrtovanje začetnih oligonukleotidov je bila uporabljena programska oprema Benchling (Preglednica 1). Vsak začetni oligonukleotid mora imeti vsaj 20 baznih parov homologije, da se omogoči ustrezna specifičnost in dobra vezava na DNK pri talilni temperaturi. Zasnovane oligonukleotide je izdelal Merck (Tabela 10). Za izvajanje reakcij PCR je bila uporabljena polimeraza DNK repliQa HiFi (Quantabio). Primer sestave reakcije PCR je prikazan v Tabeli 11, program za reakcijo PCR pa v Tabeli 12.

Tabela 10. Seznam oligonukleotidnih začetnikov za pripravo senzorjev na osnovi CARD8.

Konstrukt	Reakcija PCR	<i>Zaporedje smernega začetnega oligonukleotida</i>	<i>Zaporedje protismernega začetnega oligonukleotida</i>
CARD8-TEVp	Prva reakcija	<i>gcagaatggcattgtagtg ggagcgactacaaggacga tgacgacaag</i>	<i>cctgtccctggaaatagaggtttt caaaaaaaaaattccagttttgtgt attgcagttc</i>
	Druga reakcija	<i>tttgaaaacctctattccagg gacaggctgaggcctgtgtg</i>	<i>cctgtccctggaaatagaggtttt caaaaaaaaaattccagttttgtgt attgcagttc</i>
CARD8-TEVp-splitLuc (N terminus)	Prva reakcija	<i>tacgactcactatagggaga cccaagcttggtaccgagct cgga</i>	<i>tccggagccgccagagcc gcccttgcgtcatcgtcctttag tc</i>
	Druga reakcija	<i>ggcggctctggcggcggtc cggaggctctgaagatgcca aaaacattaagaagggc</i>	<i>acactatagaataggccctcta gactatttaccgtgtccagcacg acg</i>
CARD8-TEVp-splitLuc (C terminus)	Prva reakcija	<i>ggcggctctggcggcggtc cggaggctctaccatgaccg agaaggagatcg</i>	<i>ggtgacactatagaatagggcc ctctagactaagaattcacggcg atcttgcc</i>
	Druga reakcija	<i>tacgactcactatagggaga cccaagcttggtaccgagct cgga</i>	<i>tccggagccgccagagcc gcccttgcgtcatcgtcctttag tc</i>
CARD8-TEVp-splitBetaLac (N terminus)	Prva reakcija	<i>ggcggctctggcggcggtc cggaggctctcaccagaa acgctggtgaa</i>	<i>ggtgacactatagaatagggcc ctctagactagccagttaatagtt tgcgcaacg</i>

	Druga reakcija	<i>tacgactcactatagggaga cccaagcttggtaccgagct cgga</i>	<i>tccggagccgccagagcc gcccttgcgtcatcgtcctttag tc</i>
CARD8-TEVp- splitBetaLac (C terminus)	Prva reakcija	<i>ggcggctctggcggcggtc cggaggctctctactactcta gcttcccggcaa</i>	<i>ggtgacactatagaatagggcc ctctagactaccaatgcttaatca gtgaggcacc</i>
	Druga reakcija	<i>tacgactcactatagggaga cccaagcttggtaccgagct cgga</i>	<i>tccggagccgccagagcc gcccttgcgtcatcgtcctttag tc</i>

Tabela 11. Reakcijska mešanica za PCR.

Komponenta	Volumen
DNK polimeraza RepliQa HiFi	12,5 µl
Smerni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75 µl
Protismerni začetni oligonukleotid (10 µM)	0,75 µl
Matrična DNK (5 ng/µl)	0,5 µl
Dimetilsulfoksid (DMSO)	0,5 µl
Voda	10 µl

Tabela 12. Program za reakcijo PCR.

Korak	Število ciklov	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1	98°C	2 min
Denaturacija DNK	25-45	98°C	5 s
Prileganje začetnih oligonukleotidov		Talilna temperatura začetnega oligonukleotida $T_m (T_m - 5)^\circ\text{C}$	5 s
Podaljševanje DNK		68°C	5 s/kb
Končno podaljševanje	1	68°C	1 min

3.1.2 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo lahko ločimo linearne molekule DNK glede na njihovo velikost. Negativno nabita DNK potuje v električnem polju proti pozitivno nabiti elektrodi. Za pripravo 1-odstotnega agaroznega gela smo odtehtali 2 g agaroze in jo zmešali z 200 ml pufra TAE. Rastopino smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler ni bila popolnoma homogena, nato pa smo jo ohladili na 50 °C. Nato smo dodali 15 µl etidijevega bromida, ki nam je omogočil vizualizacijo DNK z UV-svetlobo. Mešanico smo vlili v posodo za gel z glavničkom in inkubirali pri sobni temperaturi približno 30 minut, dokler se ni gel popolnoma strdil. Nato smo zmešali 5 µl nanašalnega barvila in 25 µl produkta reakcije PCR ter mešanico nanесли na gel. Gelska elektroforeza je potekala 40 minut pri 40 V z uporabo sistema za elektroforezo Biorad. Pri delu z

etidijevim bromidom in UV-svetlobo smo bili še posebej previdni (uporabili smo dodatne varnostne ukrepe) zaradi njunega možnega mutagenega delovanja.

3.1.3 Izolacija in čiščenje DNK

Za izolacijo fragmentov DNK iz gela smo uporabili komercialno dostopen komplet reagentov DNA Clean-Up, Gel Extraction Kit, peqGOLD (VWR PeqGold), v skladu z navodili proizvajalca. Najprej smo iz agaroznega gela izrezali želeni fragment, dodali 300 μ l vezavnega pufra XP2 in vzorec 7 minut inkubirali pri 60 °C, dokler zmes ni postala homogena. Nato smo sestavili minikolono peqGOLD DNK in 2 ml zbiralno epruveto, v katero smo nato dodali našo mešanico in jo 1 minuto centrifugirali pri 10 000 vrtljajih na minuto (angl. rotations per minute, rpm). Dodali smo 300 μ l vezalnega pufra XP2 in centrifugirali pri največji hitrosti eno minuto. Po vsakem koraku centrifugiranja smo filtrat zavrgli. Nato smo kolono eno minuto centrifugirali s 700 μ l 80-odstotnega etanola. Nato smo centrifugirali kolono brez raztopin, da smo odstranili preostali etanol, nazadnje pa smo eluirali DNK tako, da smo dodali 30 μ L vode in kolono inkubirali 2 minuti pri sobni temperaturi, čemur je sledilo 2-minutno centrifugiranje pri 10.000 vrtljajih na minuto.

3.1.4 Metoda izotermalnega lepljenja po Gibsonu

Metoda izotermalnega lepljenja po Gibsonu je metoda, ki omogoča združevanje različnih fragmentov DNK z eno samo izotermno reakcijo. Reakcija poteka s tremi encimi; a) 5' eksonukleazo, ki ustvari dolge previsne konce, b) polimerazo, ki na podlagi enoverižne matrične DNK omogoči nastanek komplementarne verige DNK, in c) ligazo DNK, ki zlepi fragmente DNK. Odločili smo se, da bomo to reakcijo uporabili za združitev naših fragmentov DNK ter tako ustvarili nov plazmid. Reakcija izotermalnega lepljenja po Gibsonu je sestavljena iz 15 μ l komercialno pripravljene mešanice reagentov, ki smo ji dodali 50 ng insertne DNK in 50 ng vektorske DNK. Mešanico smo inkubirali 30-45 minut pri 50 °C.

3.1.5 Transformacija kompetentne bakterije *Escherichia coli*

Transformacija je postopek vnosa tuje DNK v bakterije, v našem primeru smo uporabili kemijsko kompetentne bakterijske celice *Escherichia coli* TOP10. Ta bakterija ni patogena za ljudi ali druge sesalce. Sposobnost bakterij, da se hitro razmnožujejo, nam omogoča, da pridobimo večje količine

našega plazmidnega konstrukta. Najprej smo odmrznjenim bakterijam *E. coli* dodali 1 μ l plazmida in mikrocentrifugirke 15 minut inkubirali na ledu, nato pa smo jih 4 minute inkubirali pri 42 °C. Nato smo jih 2 minuti inkubirali na ledu. Nato smo dodali 800 μ l tekočega gojišča Luria Bertani (LB; gojišče, ki se uporablja za pomoč pri rasti bakterij) in mikrocentrifugirke inkubirali eno uro pri 37° ob stresanju (400-500 vrtljajev na minuto). Nato smo mikrocentrifugirke centrifugirali 3 minute pri 7 000 vrtljajih na minuto in nato pelet ponovno suspendirali v 50 μ L LB. Nato smo celično suspenzijo nanесли na agarno ploščo z antibiotikom ampicilinom (za uničenje bakterij, ki ne vsebujejo plazmida) in ploščo čez noč inkubirali pri 37 °C.

3.1.6 PCR na osnovi kolonij

PCR na osnovi kolonij je metoda za preverjanje pravilne sestave kloniranega konstrukta DNK. Po transformaciji je čez noč na agarni plošči zraslo več kolonij bakterij; s konicami nastavkov za pipete smo izbrali več kolonij in jih nanесли na svežo agarno ploščo ter jih označili z različnimi številkami (tako se lahko bakterije ponovno razmnožijo, če bi potrebovali več določenega plazmida). Nato smo nastavke dodali v mikrocentrifugirke, ki so vsebovale mešanico reagentov za PCR (Tabela 13), in izvedli reakcijo PCR v skladu s programom, opisanim v Tabeli 14. Nato smo dolžino fragmentov DNK analizirali s kapilarno gelsko elektroforezo (QIAxcel, Qiagen). Ta metoda nam omogoča, da preverimo, ali je velikost konstrukta (v baznih parih) enaka pričakovani. V prekončno kulturo smo nato prenesli le bakterije, ki so nosile plazmid ustrezne velikosti.

Tabela 13. Reakcijska mešanica za PCR.

Komponenta	Količina
Polimeraza DreamTaq	5 μ l
Smerni začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,5 μ l
Protismerni začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,5 μ l
Matrična DNK	Nastavek za pipete, s katerim smo se prej dotaknili bakterijske kolonije
Voda	4 μ l

Tabela 14. Program za reakcijo PCR na osnovi kolonij.

Korak	Število ciklov	Temperatura	Čas
Začetna denaturacija	1	95°C	1-3 min
Denaturacija DNK	25-45	95°C	30 s

Prileganje začetnih oligonukleotidov		Talilna temperatura začetnega oligonukleotida $T_m (T_m-5)^\circ\text{C}$	30 s
Podaljševanje DNK		72°C	1 min/kb
Končno podaljševanje	1	72°C	5-15 min

3.1.7 Izolacija in čiščenje plazmidne DNK

Za izolacijo in čiščenje plazmidne DNK je bil uporabljen komplet reagentov Miniprep Qiagen. Prekonočno kulturo smo najprej centrifugirali 5 minut pri 12.000 vrtljajih na minuto, nato smo pelet resuspendirali v 250 μl pufru za resuspenzijo (z RNazo) in mešanico prenesli v mikrocentrifugirko. Mešanici smo dodali 250 μl lizirnega pufru, premešali, dodali 350 μl nevtralizacijske raztopine in ponovno premešali. Nato smo suspenzijo deset minut centrifugirali pri 12.000 vrtljajih na minuto. Potem smo supernatant (bistra tekočina na vrhu bele oborine, ki vsebuje beljakovine in membrane) s pipeto prenesli v kolono, pri tem pa smo bili previdni, da ne bi motili oborine. Kolono z vezano DNK smo centrifugirali, da smo se znebili odvečne tekočine. Nato smo dodali 500 μl raztopine za izpiranje (80 % etanol), vzorec centrifugirali 60 sekund pri 12.000 vrtljajih na minuto in zavrgli filtrat; ta postopek smo ponovili dvakrat. Za odstranitev odvečne izpiralne tekočine smo vzorec centrifugirali še eno minuto. Nato smo kolono prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 50 μl elucijskega pufru (voda), da bi iz kolone eluirali plazmidno DNK. Vzorec smo dve minuti inkubirali pri sobni temperaturi in ga nato dve minuti centrifugirali pri 12.000 vrtljajih na minuto. Koncentracijo DNK smo določili z merjenjem absorbance pri 260 nm z napravo Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Da bi preverili, ali je zaporedje pridobljenega plazmida enako načrtovanemu, smo vse novo pripravljene plazmide poslali na sekvenciranje DNK.

3.1.8 Sesalske celične kulture

Celično linijo človeških embrionalnih ledvic (HEK) 293T smo pridobili iz zbirke celičnih kultur *American Type Culture Collection* (ATCC). Celice smo gojili v gojišču DMEM, dopolnjenim z 10 % fetalnega seruma, pri 37 °C v okolju s 5 % CO₂. Za presajanje celic smo najprej odstranili gojišče in celice sprali s 5 ml fosfatnega pufru (PBS), nato pa dodali 2 ml raztopine tripsina/EDTA, ki je odlepila celice s površine plošče. Po enominutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo celicam dodali gojišče DMEM z namenom inaktivacije delovanja tripsina. Celice smo nato centrifugirali 5 minut pri 1200 vrtljajih na minuto, nato pa smo pelete ponovno suspendirali v 10 ml svežega

medija. Nato smo 10 µl celične suspenzije zmešali z 10 µl tripanskega modrila in prešteli število živih celic z avtomatskim števcem celic Luna (Logos Biosystems). Za meritve luciferaze in beta-laktamaze smo v plošče s 96 vdolbinicami nasadili 20.000 celic na vdolbinico. Za konfokalno mikroskopijo je bilo 60.000 celic na vdolbinico nasajenih v osem prekatne komore za gojenje celic (Ibidi).

3.1.9 Prehodna transfekcija plazmidne DNK v sesalske celice

Transfekcija je postopek, ki se uporablja za vnos RNK ali DNK v celice sesalcev s pomočjo lipidnih ali drugih polimernih reagentov, kot sta Lipofectamine 2000 ali polietilenimin. Celice HEK293T smo pri 80 do 90-odstotni preraščenosti transficirali z mešanico DNK in Lipofectamine 2000 (Invitrogen). DNK smo najprej zmešali z gojiščem Optimem, nato pa dodali mešanico Optimema in reagenta Lipofectamine 2000 (0,5 µl na 100 ng DNK v eno vdolbinico 96-delne plošče). Po 20-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo v vsako vdolbinico plošče s 96 vdolbinicami po kapljicah dodali 50 µl mešanice za transfekcijo. Vse celice smo nato pred končno analizo 48 ur gojili pri 37 °C v okolju s 5 % CO₂. Prazen vektor pcDNA3 je služil kot kontrola za spremljanje učinka postopka transfekcije in tudi za izenačitev skupnih količin DNK v različnih eksperimentalnih pogojih. Transfekcije praznega vektorja (pcDNA3) so bile uporabljene kot negativna kontrola, transfekcije senzorskega konstrukta pa so bile uporabljene za ugotavljanje, ali je mogoče senzorski encim rekonstituirati brez aktivacije CARD8. Uporabljene so bile različne koncentracije plazmidov, ki nosijo zapis za proteaze, da bi ugotovili, ali je aktivacija senzorja odvisna od stopnje aktivnosti proteaz. V Tabeli 15 so navedene količine plazmidov, s katerimi smo transficirali celice HEK293T z namenom testiranja sistema razcepljene luciferaze in sistema razcepljene beta-laktamaze.

Tabela 15. Količine plazmidov, ki smo jih uporabili pri transfekciji celic HEK293T.

Plazmid	Količina
Sistem razcepljene luciferaze	
CARD8-splitLucN	50 ng
CARD8-splitLucC	50 ng
Proteaza HIV	25-75 ng

Proteaza TEV	25-75 ng
Sistem razcepljene beta-laktamaze	
CARD8-splitBetaLacN	10-30 ng
CARD8-splitBetaLacC	10-30 ng
Proteaza TEV	50 ng

3.1.10 Konfokalna mikroskopija

Da bi analizirali, ali je inflamatom CARD8 mogoče rekonstruirati v celicah HEK293T, smo celice HEK293T nasadili v osem prekatne komore za gojenje celic in jih transficirali s plazmidi, ki kodirajo CARD8-mNeonGreen (Addgene 169991; 225 ng/prekat) ali CARD8-TEV-splitLuc (225 ng/ prekat), pro-kaspazo-1 (20 ng/ prekat), gasdermin D (60 ng/ prekat) in v izbranih primerih tudi proteazo TEV (270 ng/ prekat) ali proteazo HIV (270 ng/ prekat). Transfekcija komponent inflamatosoma CARD8 brez plazmidov, ki kodirajo proteaze TEV in HIV, je služila kot negativna kontrola za določitev osnovne aktivnosti inflamatosoma. Znani aktivator CARD8 Val-boroPro smo uporabili kot pozitivno kontrolo za vzpostavitev sistema v celicah HEK293T. Po 48 urah gojenja pri 37 °C in 5 % CO₂ smo jedra celic obarvali z barvilom Hoechst 33342 (1 mg/l). Celice smo opazovali pod invertnim laserskim mikroskopom Leica TCS SP5 z modulom Leica DMI 6000 CS, opremljenim z objektivom HCX Plane-Apochromat lambda blue 63× in numerično aperturo 1,4. Izražanje barvila Hoechst 33342 smo preverili z 20-mW diodnim laserjem pri ekscitaciji 405-nm in spremljanjem signala med 430 in 490 nm. Izražanje mNeonGreen smo preverili s 100-mW argonskim laserjem, pri ekscitaciji 505-nm in spremljanjem signala med 510 in 550 nm s fotopomnoževalko. Slike smo pripravili s programsko opremo LAS AF Lite.

3.1.11 Luciferazni test

Celice HEK293T smo 48 ur po transfekciji lizirali s 25 µl pufru za pasivno lizo na vdolbinico. Za spremljanje aktivnosti senzorja CARD8-TEV-splitLuc smo v 96-prekatno ploščo dodali substrat luciferin (2 mM), dopolnjen s kofaktorji (ATP, DTT in koencim A). Kresničkina luciferaza katalizira tvorbo oksiluciferina, ki ga spremlja emisija svetlobe. Luminiscenco smo izmerili s čitalnikom mikrotitrskih plošč (Centro LB 963, Berthold Technologies).

3.1.12 Beta-laktamazni test

Celice HEK293T smo 48 ur po transfekciji lizirali s 25 μ l pufru za pasivno lizo na vdolbinico. Za spremljanje aktivnosti senzorja CARD8-TEV-splitBetaLac smo celični lizat zmešali z mešanico PBS, vode in substrata nitrocefina (100 μ M). Nato smo vzorce dve uri inkubirali pri sobni temperaturi in analizirali spremembo barve substrata iz rumene (negativen rezultat) v rdečo (pozitiven rezultat) z vizualnim zaznavanjem in tudi z merjenjem absorbance pri 492 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč (SynergyMx, BioTek).

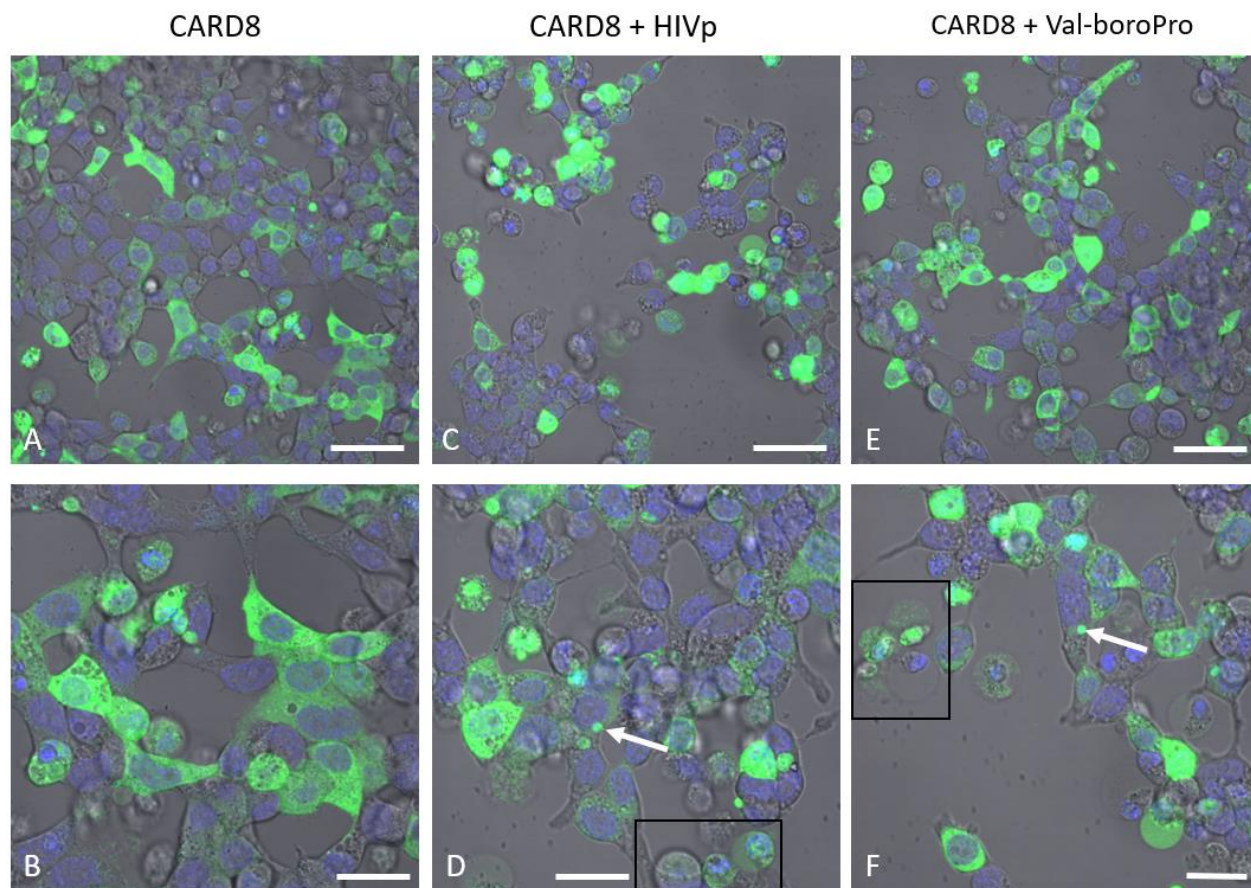
3.1.13 Statistična analiza

Za vse poskuse so bile z uporabo programa GraphPad Prism 8 izračunane povprečna vrednost, standardna napaka povprečja in t-testi. Vsak poskus sta vsaj dvakrat neodvisno ponovila dva neodvisna izvajalca (3 ponovitve na pogoj na neodvisen poskus). Statistična značilnost med dvema skupinama vzorcev je bila določena s t-testom. P-vrednosti, manjše od 0,05, smo šteli za statistično značilne.

4 REZULTATI

4.1 Inflamasom CARD8 smo uspešno rekonstruirali v celicah HEK293T

Odločili smo se, da za razvoj in validacijo zasnovanih senzorjev uporabimo dobro uveljavljeno in za uporabo enostavno človeško celično linijo HEK293T. Tako smo najprej preizkusili, ali je ta celična linija primerna za rekonstrukcijo inflamasoma CARD8. Naš cilj je bil rekonstruirati inflamasom CARD8 v celicah HEK293T, ki sicer naravno ne izražajo komponent inflamasoma CARD8. Zato smo transficirali celice HEK293T z Lipofektaminom 2000 s plazmidi, ki so nosili naslednje komponente: CARD8-mNeonGreen, prokaspazo 1 in gasdermin D. V naravi aktivacijo inflamasoma CARD8 sproži proteaza virusa HIV, zato smo se odločili, da HIV cepitveno mesto ohranimo v našem zasnovanem senzorju. Senzor lahko aktiviramo tudi z dodatkom Val-boroPro, majhne molekule, ki zavira DPP8/9 in je znani aktivator inflamasoma CARD8. S konfokalno mikroskopijo smo dokazali, da brez ustreznega sprožilca ne pride do aktivacije CARD8, saj piroptoze nismo zaznali (Slika 7A, B). Transfekcija s konstruktom, ki kodira proteazo HIV (Slika 7C, D) ali dodatek Val-boroPro (Slika 7E, F) sproži piroptotično celično smrt z značilno balonsko morfologijo. Ker je imel CARD8 na C-koncu pripet fluorescenčni protein, smo opazili, da fragmenti CARD8-mNeonGreen po aktivaciji tvorijo skupke, kar je ključno za zasnovano naših senzorjev. Ti rezultati potrjujejo, da lahko inflamasom CARD8 uspešno rekonstruiramo v celicah HEK293T in da je ta celična linija primeren sistem za testiranje naših zasnovanih senzorjev.

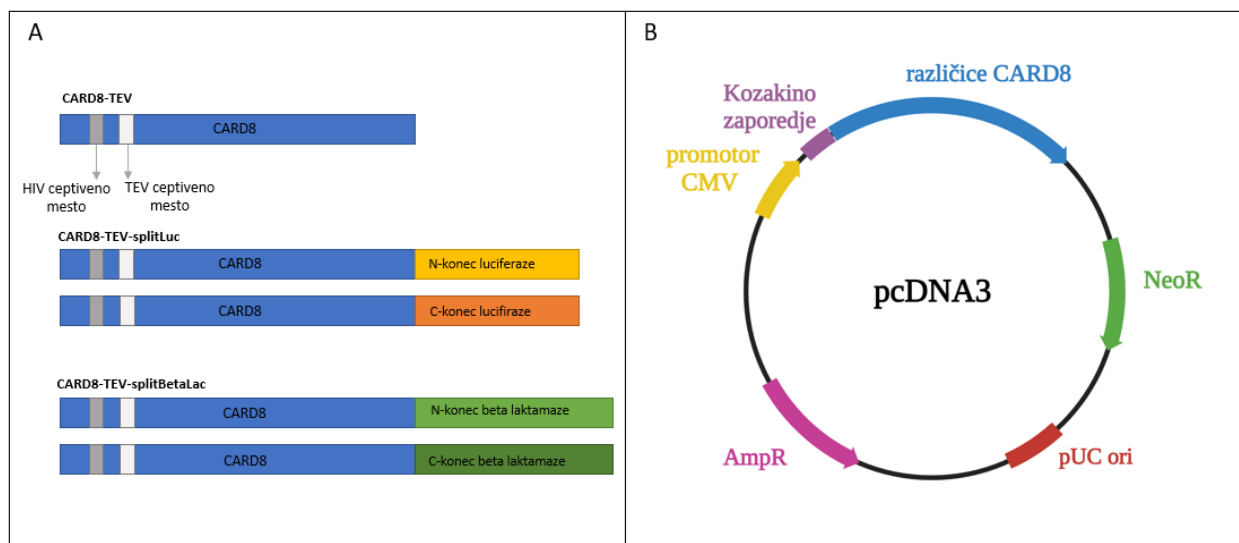


Slika 7. Inflamasoma CARD8 je mogoče rekonstruirati v celicah HEK293T. (A, B) Celice, ki izražajo vse komponente inflamasoma CARD8 (CARD8-mNeonGreen, prokaspazo 1 in gasdermin D) brez ustreznega aktivatorja, niso podvržene piroptozii. (C-F) Inflamasom CARD8 se aktivira in povzroči celično smrt po aktivaciji s proteazo HIV ali dodatku Val-boroPro. Pravokotniki prikazujejo primere piroptotičnih celic z balonasto morfologijo. Puščice prikazujejo oligomere fragmentov CARD8-mNeonGreen, ki nastanejo po aktivaciji CARD8. Celična jedra so obarvana modro, fuzijski protein CARD8-mNeonGreen pa je predstavljen zeleno. Prikazane so izbrane slike iz enega poskusa na podlagi petih neodvisnih poskusov. Merilca (A, C, E) 50 μm, (B, D, F) 20 μm.

4.2 Dizajn in priprava plazmidov, ki kodirajo senzorje virusne aktivnosti na osnovi CARD8

Nove senzorje virusne aktivnosti smo načrtovali tako, da so bili sestavljeni iz senzorske komponente (modificiran CARD8 z dodanimi cepitvenimi mesti za proteaze), ki zazna prisotnost virusa z zaznavanjem aktivnosti virusne proteaze, in komponente razcepljenih encimov (razcepljene kresničkine luciferaze ali razcepljene beta-laktamaze), ki proizvede merljiv signal

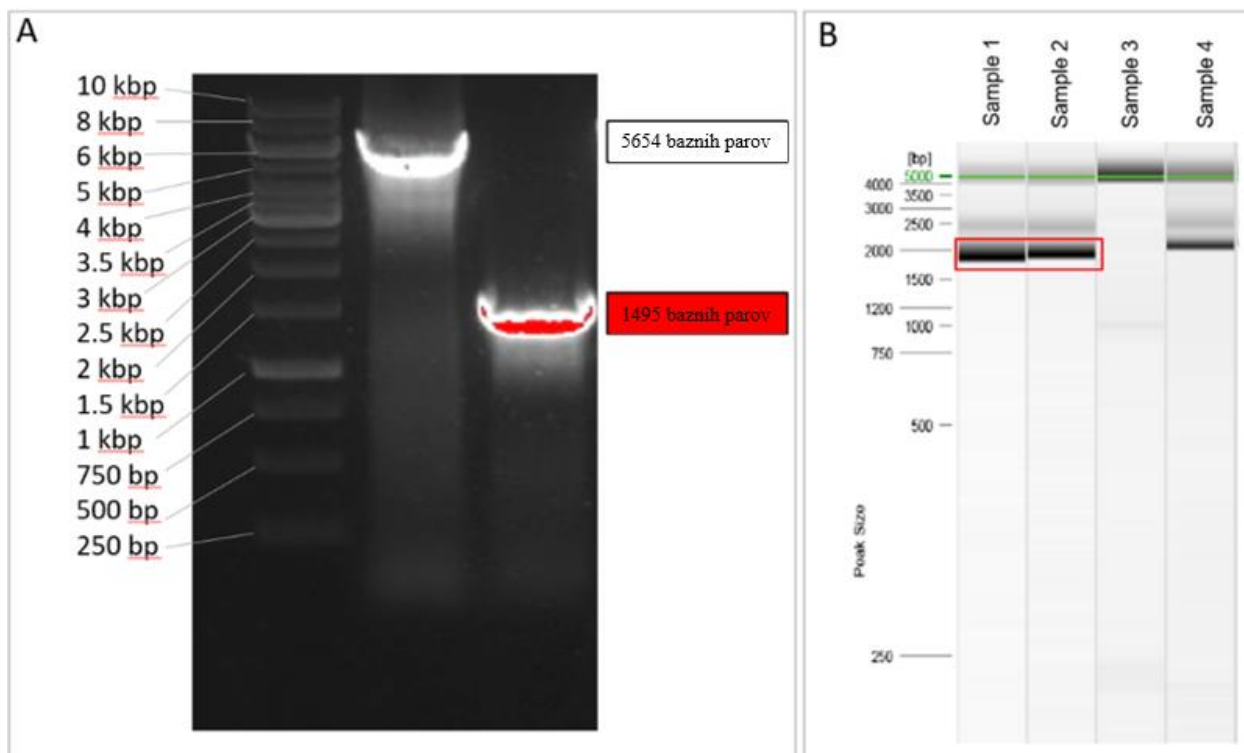
(Slika 8A). Ker želimo izdelati virusne senzorje, ki bi zaznavali aktivnost različnih virusov, smo cepitveno mesto proteaze virusa TEV vstavili poleg cepitvenega mesta proteaze virusa HIV, ki je naravno prisotno v CARD8, da omogočimo odkrivanje dveh vrst virusa z uporabo istega virusnega sensorja (Slika 8A). Čeprav proteaza TEV (virus tobačnega jedkanja; angl. tobacco etch virus) izvira iz rastlinskega virusa, je njeno zaporedje mesta cepitve dobro definirano, zato smo to proteazo uporabili za vzpostavitev sistema. Namen je, da proteaza TEV cepi CARD8 in povzroči, da se N-konec molekule CARD8 razgradi, C-konec pa oligomerizira, kar omogoči rekonstrukcijo razcepljenih proteinov. To bi lahko potrdili z uporabo beta-laktamaznega in luciferaznega testa, ki sta opisana kasneje v nalogi.



Slika 8. Dizajn in shema senzorjev CARD8(A) Konstrukti, pripravljene v okviru te študije, CARD8 s cepitvenim mestom proteaze virusa TEV (CARD8-TEV) in virusnimi senzorji CARD8-TEV-splitLuc in CARD8-TEV-splitBetaLac. (B) Splošna plazmidna shema konstrukta CARD8-TEV. Prikazana je shema vektorja pcDNA3 z vnesenim CARD8

Najprej smo uporabili metode molekularnega kloniranja za pripravo plazmidov, ki imajo vnesena zaporedja, kodirajoča senzorje virusne aktivnosti na osnovi CARD8. Za ponazoritev poteka dela opisujemo pripravo enega takega konstrukta, CARD8-TEV (Slika 8A), ki je služil kot osnova za oba senzorja. Vsi konstrukti so bili pripravljene z uporabo iste metodologije, kot je prikazana za pripravo CARD8-TEV in opisana v poglavju o metodah. Najprej smo izvedli reakcijo PCR, s katero smo pridobili zelene fragmente DNK, in sicer t.i. insertno DNK (1495 baznih parov) in

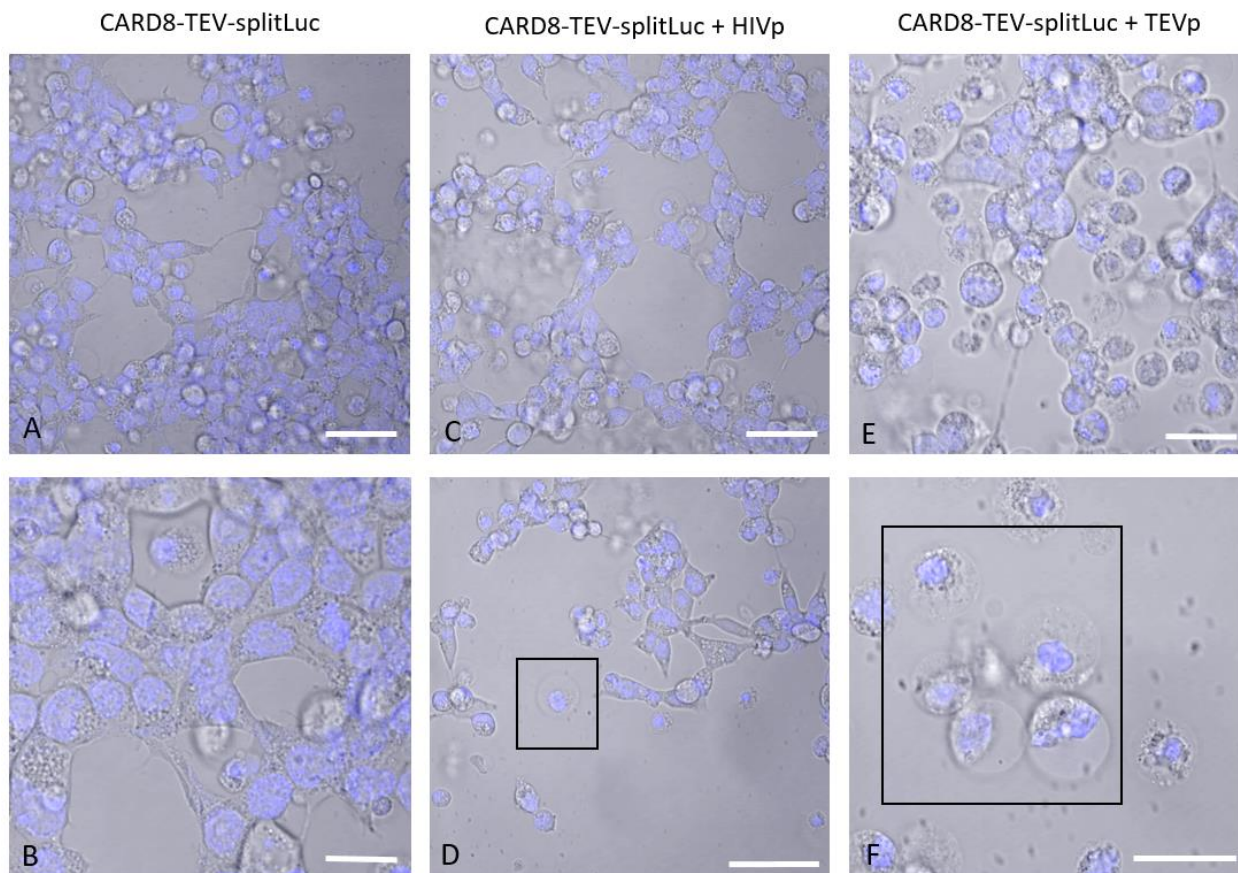
vektorsko DNK (5654 baznih parov) (Slika 9A). Nato smo s metodo izotermalnega lepljenja po Gibsonu združili obe komponenti v želeni plazmid, s katerim smo nato transformirali bakterijske celice *E. coli*. Da bi preverili, ali smo dobili konstrukt prave velikosti (pomnožek PCR velikosti 1914 baznih parov), smo izvedli PCR na osnovi kolonije (Slika 9B). Bakterije, ki so nosile plazmid z insertom ustrezne velikosti, smo nato uporabili za pripravo prekonočne kulture. Naslednji dan smo iz nje izolirali plazmide in te poslali na sekvenciranje po Sangerjevi metodi. To smo naredili, da bi preverili, ali se dejansko zaporedje DNK ujema z zasnovanim zaporedjem DNK.



Slika 9: Priprava konstrukta CARD8-TEV. (A) Za sestavo konstrukta CARD8-TEV smo najprej pridobili segment CARD8 z mestom cepitve proteaze TEV (1495 baznih parov) in vektorsko DNK (5654 baznih parov) z uporabo reakcije PCR. Nato smo izvedli agarozno gelsko elektroforezo in nato izolirani ter očistili DNK iz agaroznega gela. Legenda prikazuje fragmente velikosti od 250 baznih parov (250 bp) do 10.000 baznih parov (10 kbp). (B) PCR na osnovi kolonije je bil izveden za oceno velikosti dobljenih konstruktov. Pričakovana velikost s PCR namnoženega fragmenta, ki vsebuje CARD8-TEV je bila 1914 baznih parov. Plazmide, ki so vsebovali ustrezen fragment (označeni z rdečim pravokotnikom) smo poslali na sekvenciranje DNK.

4.3 Aktivacija senzorja CARD8-TEV-splitLuc s proteazama TEV ali HIV sproži piroptozo

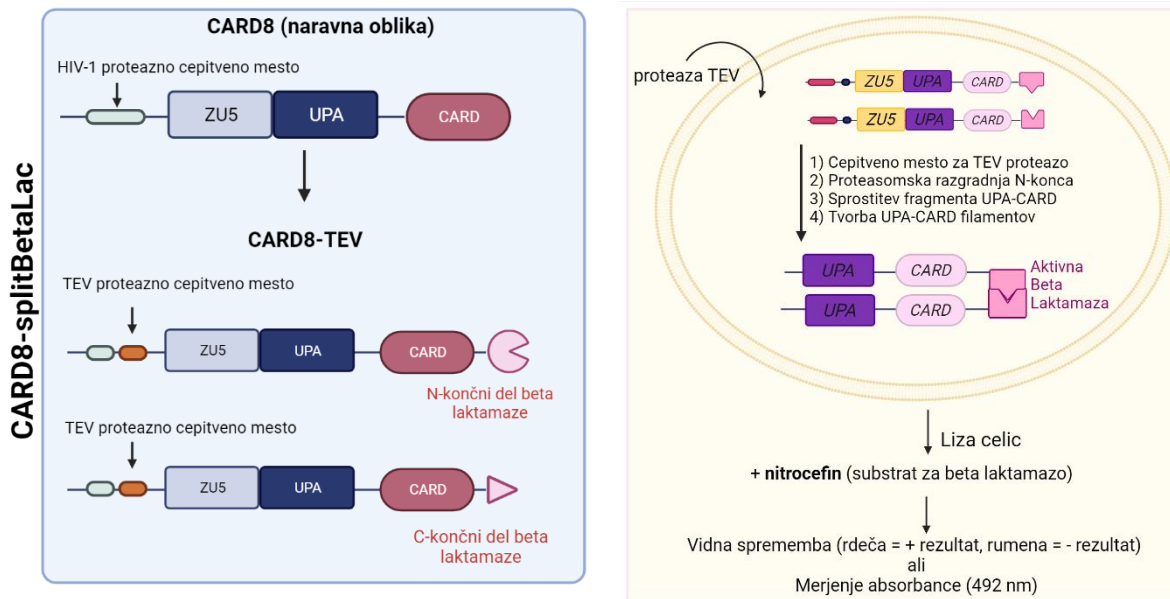
Da bi preizkusili, ali modifikacija CARD8 (vključitev mesta cepitve TEV) in dodatek komponente razcepljenega encima (t.j. razcepljene luciferaze) vplivata na sposobnost CARD8, da sproži piroptozo v celicah HEK293T, smo celice transficirali s plazmidi, ki kodirajo CARD8-TEV-splitLuc senzor (dva plazmida), prokaspazo1 in gasdermin D. S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da senzor CARD8-TEV-splitLuc brez aktivatorja ne povzroča celične smrti v celicah HEK293T (Slika 10A, B). Ko so bile celice transficirane s plazmidom, kodirajočim proteazo HIV (Slika 10C, D) ali proteazo TEV (Slika 10E, F), je proteolitična cepitev CARD8 vodila v oligomerizacijo in nato v piroptozo, kar dokazuje, da je senzor CARD8-TEV-splitLuc sposoben sprožiti celično smrt v celicah HEK293T. To dokazuje, da dodatek razcepljene luciferaze v CARD8 ne zavre njegove aktivnosti kot senzorja, ki tvori inflammasom in da vstavitev novega mesta cepitve proteaze omogoči aktivacijo CARD8 s proteazo, ki sicer ne aktivira CARD8. Pripravili smo torej senzor, ki ga lahko aktivirata dve različni proteazi.



Slika 10. Proteolitična cepitev senzorja *CARD8-TEV-splitLuc* s proteazo HIV ali TEV povzroči piroptozo. (A, B) Senzor *CARD8-TEV-splitLuc* brez ustreznega aktivatorja ne povzroči celične smrti. (C-F) Proteazi HIV in TEV inducirata oligomerizacijo senzorja *CARD8-TEV-splitLuc* in vodita do kasnejše piroptotične celične smrti. Pravokotniki prikazujejo piroptotične celice z balonasto morfologijo. Prikazane so reprezentativne slike iz enega poskusa na podlagi petih neodvisnih poskusov. Merilca (A,C) 50 μm , (B, D, E, F) 10 μm .

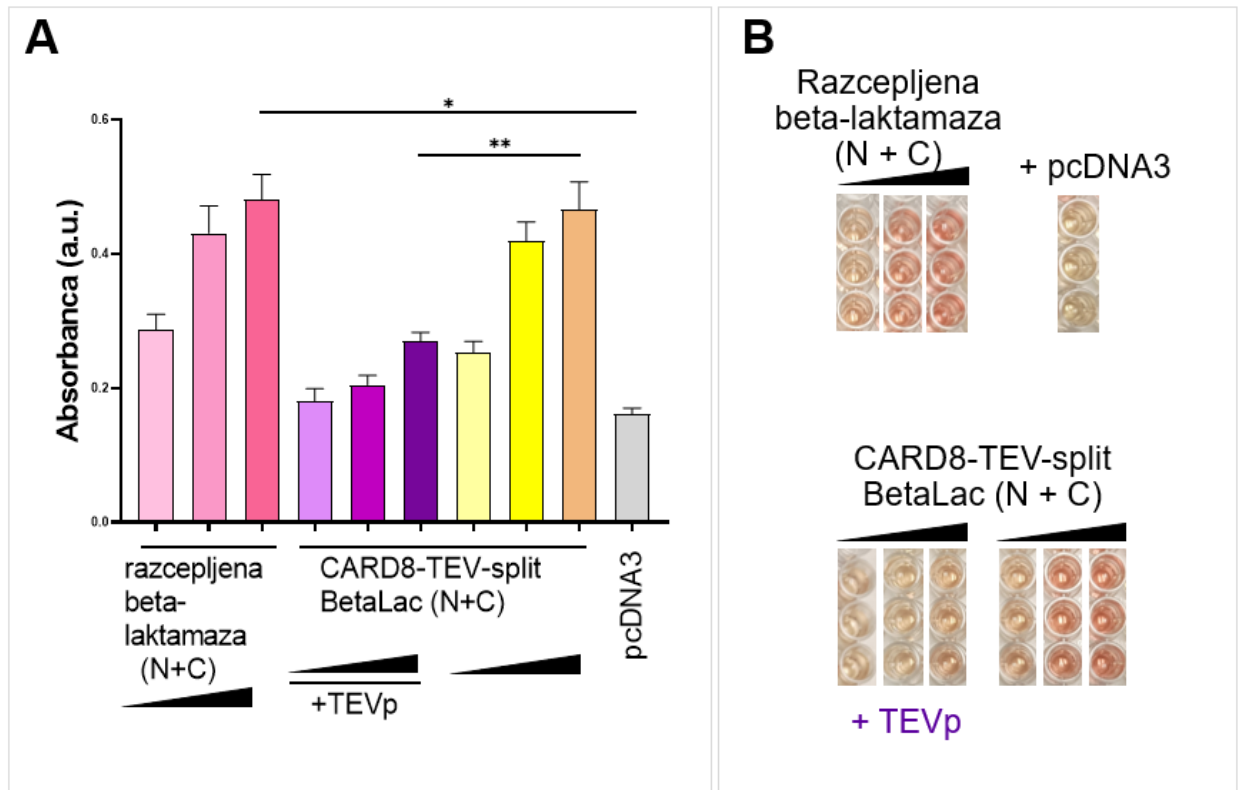
4.4 Senzor *CARD8-TEV-splitBetaLac* ne zaznava virusne aktivnosti

Najprej smo vzpostavili senzor na osnovi *CARD8*, ki naj bi po cepitvi s proteazo TEV povzročil oligomerizacijo *CARD8* in posledično rekonstrukcijo razcepljene beta-laktamaze (Slika 11). Ob dodatku nitrocefina, ki je substrat beta-laktamaze, smo analizirali aktivnost senzorja *CARD8-splitBetaLac* z merjenjem absorbance pri 492 nm ali z vizualnim zaznavanjem spremembe barve substrata. Če rekonstrukcije beta-laktamaze ni, je barva substrata ostala rumena, kar kaže na negativen rezultat, medtem ko je sprememba barve v oranžno ali rdečo nakazovala uspešno rekonstrukcijo beta-laktamaze (temnejša je barva, večja je aktivnost beta-laktamaze).



Slika 11: Shema dizajna CARD8-TEV-splitBetaLac (A) in zasnove eksperimenta (B).

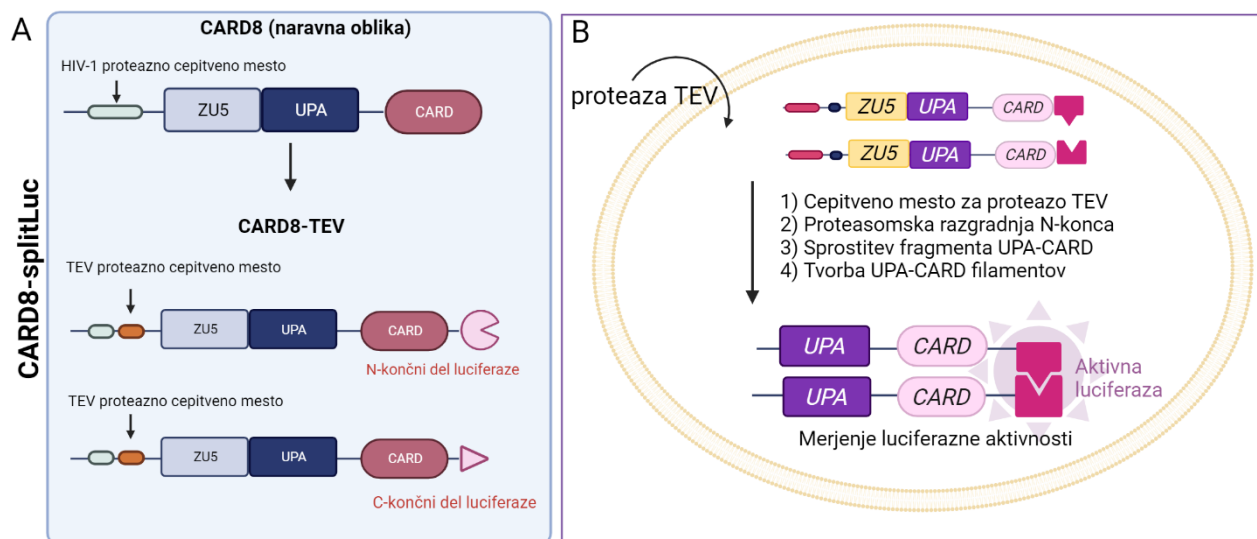
Glede na to, da smo uporabili že uveljavljen sistem razcepljene beta-laktamaze (Galarneau et al., 2002), smo pričakovali, da izražanje N- in C-konca beta-laktamaze brez partnerskih proteinov, ki povežejo oba dela, ne bo privedlo do rekonstitucije encimske aktivnosti beta laktamaze. V nasprotju s pričakovanji naši rezultati kažejo, da se razcepljena beta-laktamaza sestavi tudi kadar posamezna dela nista vezana na CARD8 ali druge proteine, kar ni zaželeno. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, ki smo jih transficirali s praznim vektorjem (pcDNA3). Podobno pride do sestavljanja beta-laktamaze tudi, kadar sta konca vezana na CARD8. Pričakovali smo, da bi sprožitve oligomerizacije CARD8-TEV-splitBetaLac v prisotnosti proteaze TEV, vodila do še izboljšane rekonstitucije razcepljene beta-laktamaze in bi to vodilo do povečanja signala. Vendar pa se zgodi ravno nasprotno, kar nakazuje, da je oligomerizacija fragmentov CARD8-splitBetaLac neugodna za sestavljanje beta-laktamaze. Čeprav prisotnost virusne aktivnosti zaznamo kot zmanjšanje signala, senzor CARD8-TEV-splitBetaLac ni primeren, saj lahko obstajajo različni vzroki za zmanjšanje signala, kar bi vodilo do nizke specifičnosti razvitega sensorja (Slika 12).



Slika 12. Senzor *CARD8-TEV-splitBetaLac* ne zazna virusne aktivnosti. Razcepljena beta-laktamaza se učinkovito rekonstruira, kar povzroči uspešno presnovo substrata, vendar se senzor *CARD8-TEV-splitBetaLac* ne odzove na cepitev s proteazo *TEV*. (A) Zaznavanje intenzivnosti absorbance. (B) Vizualno zaznavanje. Vsaka točka prikazuje povprečje dveh neodvisnih poskusov (3 tehnične ponovitve za vsak neodvisen poskus). (*) prikazujejo statistično značilne razlike med izbranimi vzorci.

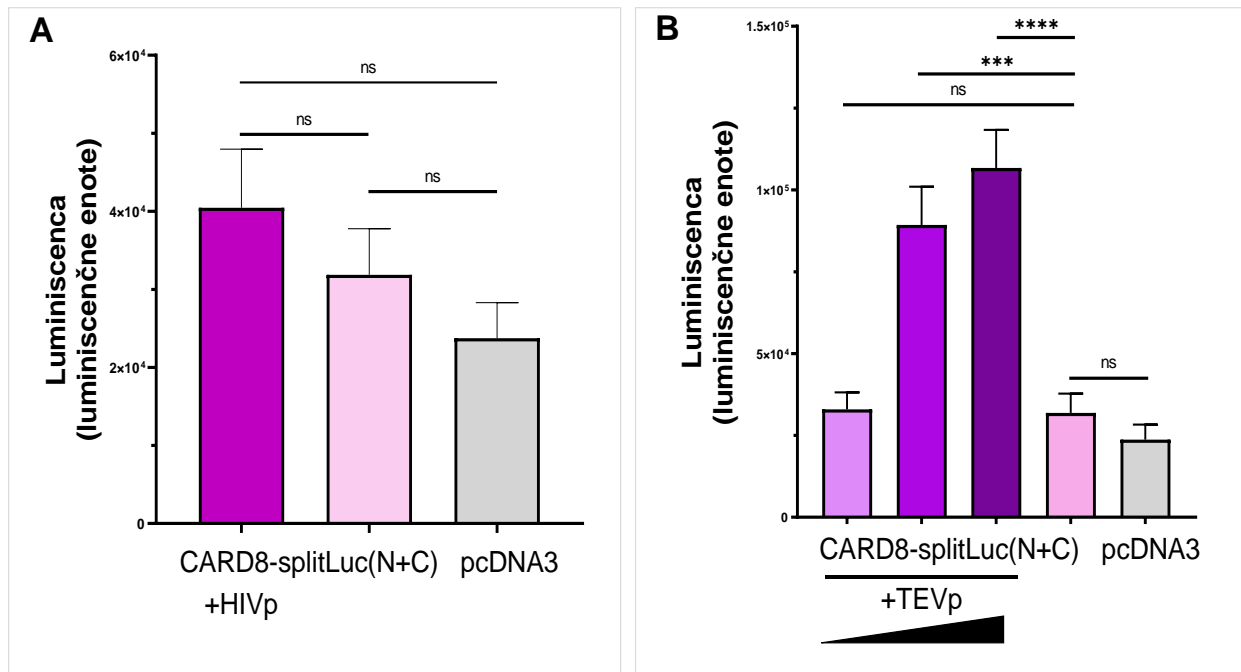
4.5 Senzor *CARD8-TEV-splitLuc* uspešno zazna virusno aktivnost

V skladu z našim dizajnom naj bi senzorstvi *CARD8-TEV-splitLuc* po cepitvi s proteazama HIV in *TEV* povzročili oligomerizacijo fragmenta *CARD8* in kasnejšo rekonstrukcijo aktivnosti razcepljene luciferaze (Slika 13).



Slika 13: Shema dizajna CARD8-TEV-splitLuc (A) in zasnove eksperimenta (B).

Z merjenjem luminiscence, ki je posledica aktivnosti rekonstruirane cepljene luciferaze, smo pokazali, da se po cepitvi CARD8-TEV-splitLuc s proteazo HIV luminiscenca poveča, kar dokazuje, da se senzor odziva na aktivacijo s proteazo HIV (Slika 14A). V primerjavi s samim senzorjem ali praznim vektorjem (negativne kontrole) aktivacija ni bila statistično značilna, kar kaže, da senzor ni zelo občutljiv na aktivacijo s proteazo HIV ali pa je aktivnost proteaze HIV precej šibka. Po drugi strani pa je bil senzor CARD8-TEV-splitLuc bistveno bolj občutljiv na aktivacijo s proteazo TEV. V odsotnosti senzorskih konstruktorjev (prazen vektor – pcDNA3) ali odsotnosti aktivnosti virusne proteaze (samo senzor – CARD8-splitLuc) je bila rekonstrukcija aktivnosti razcepljene luciferaze statistično neznačilna, kar dokazuje, da se senzor aktivira samo v prisotnosti virusne proteaze. Poleg tega naši rezultati kažejo, da je bila luminiscenca statistično značilno večja, ko je bil senzor aktiviran s proteazo TEV (50 ng, 75 ng transficiranega plazmida, ki kodira proteazo TEV). Pomembno je, da je bil odziv sensorja odvisen od odmerka (povečanje količine transficirane proteaze TEV je povzročilo večjo luminiscenco) (Slika 14B).



Slika 14. Senzor CARD8-TEV-splitLuc je senzor aktivnosti virusne proteaze. (A) Zaznavanje aktivnosti proteaze HIV s senzorjem CARD8-TEV-splitLuc. (B) Zaznavanje aktivnosti proteaze TEV s senzorjem CARD8-TEV-splitLuc. Transficirali smo različne mase plazmida, ki kodira TEVp (25ng, 50 ng, 75ng). Vsaka točka prikazuje povprečje dveh neodvisnih poskusov (3 tehnične ponovitve za vsak neodvisen poskus). Povprečje in S.E.M. so prikazani. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. ns – Razlika med vzorci ni statistično značilna.

5 DISKUSIJA

Nalezljive bolezni se pojavljajo povsod po svetu in negativno vplivajo tako na ljudi kot živali. Viruse je pogosto težko odkriti in njihove okužbe težko zdraviti, kar resno ogroža javno zdravje in svetovno gospodarstvo. Zgodnje odkrivanje okužb lahko reši življenja okuženih in tistih, na katere se lahko bolezen prenese. Posledično je razvoj hitrih, natančnih in poceni metod za zgodnje odkrivanje virusnih okužb ključnega pomena (Ozer et al., 2020).

Tradicionalne metode za odkrivanje virusov, kot sta kvantitativna PCR in ELISA (encimski imunski test), imajo nekaj pomanjkljivosti, saj zahtevajo izolacijo virusa, posebno opremo in usposobljeno osebje, na njihovo specifičnost in občutljivost pa vplivajo virusne mutacije (Kiselev et al., 2020). Zato smo se odločili razviti nov senzor, ki bi temeljil na zaznavanju dejanske virusne aktivnosti in ne samo prisotnosti posameznih komponent virusa, hkrati pa bi bil enostaven za uporabo in bi zahteval zelo malo posebne opreme.

Vsi eksperimentalni pogoji so bili testirani v dveh ali treh tehničnih ponovitvah in vsak poskus je bil izveden večkrat, da smo zagotovili biološke ponovitve s podobnimi trendi. Variabilnost rezultatov je bila določena s primerjavo rezultatov različnih poskusov, ki so bili po potrebi tudi statistično ovrednoteni.

5.1 Aktivacijo inflamasma CARD8 lahko vzpostavimo v celicah HEK293T

Inflamasomi so naravno aktivni v monocitih in makrofagih in tudi drugih celicah, ne pa v celicah HEK293T, ki se pogosto uporabljajo za razvoj biosenzorjev. V prvem delu projekta smo želeli preveriti, ali je možno vzpostaviti inflamasm CARD8v celicah HEK293T. To smo naredili s pomočjo transfekcije celic HEK293T z vsemi komponentami, potrebnimi za aktivacijo inflamasma, kar bi vodilo v celično smrt. Natančneje, celice smo transficirali s plazmidi, ki nosijo CARD8, pro-kaspazo 1 in gasdermin D. Inflasmom CARD8 je mogoče kemično aktivirati z Val-boroPro ali s HIV proteazo. S konfokalno mikroskopijo smo dokazali, da lahko aktivacijo inflamasma CARD8 rekonstruiramo v celicah HEK293T z obema aktivatorjema, ki sta uspešno sprožila celično smrt. Naši rezultati tako potrjujejo predhodne ugotovitve Wanga in sodelavcev, ki so identificirali CARD8 kot senzor okužbe z virusom HIV (Wang et al., 2021), ter Johnsona in

sodelavcev, ki so pokazali, da se CARD8 aktivira z inhibitorjem DPP8/9, t.j. Val-boroPro (Johnson et al., 2018). Nato smo preverili, ali lahko rekonstruiramo inflamasom CARD8 z uporabo senzorja CARD8-TEV-splitLuc. Kljub modifikacijam molekule CARD8 in dodatku sistema razcepljenih proteinov (razcepljena luciferaza), nam je uspelo sprožiti aktivacijo inflamasoma CARD8 z uporabo proteaz TEV in HIV. Ti rezultati **potrjujejo našo prvo hipotezo, ki napoveduje, da inflamasom CARD8 lahko vzpostavimo v celicah HEK293T**, in dokazujejo, da so celice HEK293T primerna celična linija za razvoj virusnega senzorja. Uporaba celične linije HEK293T je bila prava izbira, saj je te celice enostavno gojiti in vzdrževati ter jih je mogoče enostavno transfecirati, s čimer celice lažje genetsko manipuliramo (Abaandou et al., 2021; Bösell et al., 2003; Kaur & Dufour, 2012).

5.2 Vzpostavitev senzorjev na osnovi CARD8 za detekcijo virusne aktivnosti

Poznamo različne inflamosome, ki se med seboj razlikujejo po strukturi in aktivacijskih signalih (Zheng et al., 2020). Odločili smo se za uporabo CARD8, saj je zaradi svoje majhnosti in enostavne sestave primeren za modifikacije z metodami sintezne biologije (Linder et al., 2020).

Tudi rezultati so potrdili, da je CARD8 primerna podlaga za razvoj našega biosenzorja - s tem smo potrdili drugo hipotezo.

5.2.1 Zmanjšanje signala senzorja CARD8-TEV-splitBetaLac v prisotnosti proteaze TEV

Beta-laktamaza je encim, prisoten v bakterijah, odpornih proti antibiotikom. Bakterije ga uporabljajo za razgradnjo antibiotikov, ki vsebujejo beta-laktamatski obroč (Tooke et al., 2019). Aktivnost beta-laktamaze je mogoče analizirati tako, da sledimo metabolizmu njenega substrata, nitrocefina. Naša ideja je bila, da bi naredili fuzijo cepljene beta-laktamaze s CARD8 in da bi po proteolitični cepitvi konstrukta prišlo do oligomerizacije CARD8 ter posledične rekonstrukcije beta-laktamaze (Galarneau et al., 2002). Prednost tega sistema je, da je reakcijo mogoče spremljati vizualno, saj ko beta-laktamaza presnavlja nitrocefina, se barva substrata spremeni iz rumene v rdečo, dodatno pa je za natančnejši odčitek mogoče vzorce analizirati tudi z merjenjem absorbanca.

Naši rezultati kažejo, da se razcepljena beta-laktamaza uspešno sestavi in je zmožna presnove substrata tudi kadar ne pride do oligomerizacije, ne potrebuje torej dodatnega signala. Po drugi strani pri fuziji razcepljene beta-laktamaze s CARD8 dobimo pozitiven rezultat samo v odsotnosti

proteaze TEV. Rezultati kažejo, da se razcepljena beta-laktamaza, spojena s CARD8, spontano sestavi (ko CARD8 ni v obliki fibril-skupkov) v odsotnosti virusne proteaze, medtem ko oligomerizacija in tvorba fibril CARD8, ki sledita cepitvi z virusno proteazo, preprečita rekonstrukcijo razcepljene beta-laktamaze. V nasprotju z našimi pričakovanji torej **rezultati kažejo, da ima razcepljena beta-laktamaza visoko avtoaktivnost, kar je v nasprotju s predhodno študijo, ki dokazuje, da sistem razcepljene beta-laktamaze sistem ni avtoaktiven** (Galarneau et al., 2002). V prihodnjih poskusih bi lahko sistem razcepljene beta-laktamaze spremenili s točkovnimi mutacijami, ki vodijo do manjše spontane sestave razcepljenega sistema, naš sistem pa bi lahko izboljšali s spremembo dolžine povezovalnega zaporedja med CARD8 in razcepljeno beta-laktamazo (trenutno je to zaporedje dolgo 10 aminokislinskih ostankov), kar bi povečalo prožnost in s tem uspešnejšo rekonstrukcijo encima.

5.2.2 Senzor CARD8-TEV-splitLuc uspešno zaznava aktivnost proteaz TEV in HIV

Za vzpostavitev senzorja CARD8-TEV-splitLuc smo uporabili razcepljeno luciferazo. Luciferaze so encimi, ki reagirajo s specifičnim substratom in v sklopu te kemične reakcije pride do emisije svetlobe (kemoluminiscenca). V naravi različne živali uporabljajo bioluminiscenco, da pritegnejo plen ali partnerje ali celo prestrašijo plenilce (Haddock et al., 2010). Luciferaza kresničke se običajno uporablja v molekularni biologiji za spremljanje različnih bioloških dogodkov v celicah, kjer se oddana svetloba uporablja za signalizacijo aktivnosti ciljnega gena ali kakšnega drugega celičnega dogodka (Paulmurugan & Gambhir, 2005).

N- in C-konca razcepljene luciferaze smo pripojili na C-konec CARD8. Po proteolitični cepitvi je fragment CARD8 oligomeriziral in to je vodilo do sestavljanja razcepljene luciferaze. Rekonstruirana luciferaza je bila sposobna presnavljati svoj substrat, luciferin, in na podlagi tega smo sledili aktivaciji senzorja CARD8-TEV-splitLuc. Testirali smo aktivacijo senzorja s cepitvijo CARD8 s proteazama HIV in TEV. Obe proteazi sta aktivirali senzor, vendar je bil senzor bolj občutljiv na aktivnost proteaze TEV. Ker nismo preverjali aktivnosti vnesenih proteaz HIV in TEV, je razlog za razliko v sposobnosti aktivacije senzorja lahko v razliki v aktivnosti proteaz ali pa dodatek mesta cepitve za proteazo TEV zmanjša učinkovitost senzorja za proteazo HIV. Po drugi strani je bil senzor zelo občutljiv na aktivacijo s proteazo TEV, saj naši rezultati kažejo, da je aktivacija senzorja odvisna od odmerka proteaze TEV.

Uporaba luciferaznega testa ima veliko prednosti, saj je test visoko zmogljiv, neradioaktiven, netoksičen, relativno poceni in ga je enostavno prilagoditi avtomatizaciji.

Naši rezultati torej potrjujejo tri hipoteze, ki napovedujejo, da je a) delovanje inflammasoma CARD8 mogoče rekonstruirati v celični liniji HEK293T; b) komponente inflammasoma CARD8 mogoče preoblikovati v senzorsko komponento (hipoteza 2) , in c) novi senzor virusne aktivnosti se bo aktiviral po cepitvi z virusnimi proteazami (hipoteza 4), delno pa potrjujejo hipotezo 3, ki pravi da so sistemi cepljenih proteinov primerni za tvorbo encimske komponente senzorja virusne aktivnosti, ki zagotavlja merljiv signal .

5.2.3 Prihodnji razvoj in potencialna uporaba senzorjev na osnovi CARD8

Delo z virusi zahteva uporabo visoko specializiranih laboratorijev, ki zagotavljajo varnost vseh izvajalcev testa. Zlasti v primeru virusa HIV bi to zahtevalo dostop do laboratorija s stopnjo biološke varnosti 3, ki so na voljo le na inštitutih, specializiranih za obravnavo nevarnih virusov. Zato smo zaradi zagotavljanja varnosti najprej izdelali senzor, ki se odzove na delovanje virusne proteaze, s čimer na varen način posnemamo delovanje virusa. Razvili smo vse komponente senzorja, a namesto da bi senzor testirali z dejanskimi virusi, smo celice transficirali s plazmidi, ki kodirajo virusne proteaze. V našem primeru smo uporabili proteazo TEV (sestavni del virusa, ki napada predvsem rastline tobaka) in proteazo HIV (sestavni del virusa, ki naravno sproži inflammasom CARD8). Proteazo TEV zaradi visoke specifičnosti pogosto uporabljajo v biotehnoških študijah. To nam je omogočilo testiranje in optimizacijo senzorjev, ne da bi se izpostavljali morebitnim okužbam. V prihodnosti moramo delovanje senzorjev testirati z uporabo dejanskih virusov. Zato bi morali uporabiti celice, ki izražajo ustrezne virusne receptorje na celični površini (npr. celična linija Vero), kar bi virusu omogočilo vstop v celice in uporabo virusne proteaze za ustvarjanje zrelih virusnih proteinov. Po transfekciji celic s senzorje bi virusne proteaze istočasno cepile senzor CARD8-TEV-splitLuc, kar bi nam omogočilo zaznavanje aktivnosti virusa z merjenjem luminiscence.

Osredotočili smo se na virusne proteaze, ki so bistvene za replikacijo virusa, zaradi česar so popolne terapevtske tarče, saj so zaradi svojega delovanja manj nagnjene k mutacijam. Tudi v primeru mutacij je naš senzor zasnovan tako, da zazna aktivnost ne glede na morebitne mutacije,

v nasprotju z drugimi sistemi, ki zaznavajo specifično zaporedje nukleinske kisline ali proteina (Zephyr et al., 2021). To nam omogoča tudi razvoj senzorjev za zaznavo drugih virusov, saj to lahko storimo preprosto samo z zamenjavo cepitvenega mesta (ta namreč igra ključno vlogo pri zaznavanju prisotnosti virusne aktivnosti posameznega virusa). Kot dokaz koncepta smo razvili biosenzor, ki lahko zazna aktivnost dveh različnih proteaz, s čimer smo nakazali, da lahko molekulo CARD8 spremenimo tako, da se odzove na različne viruse. Čeprav z uporabo takšnega senzorja ne bi mogli s popolno natančnostjo določiti, kateri virus povzroča okužbo, je tudi biosenzor, ki zazna različne viruse, lahko zelo koristen v primerih, ko bi želeli ugotoviti, ali je bolezen posledica virusne okužbe (npr. vnetje srčne mišice). Uporaben je tudi za razvoj zaviralcev virusnih proteaz kot zdravil za terapijo virusnih bolezni.

6 ZAHVALA

Zahvaljujeva se obema mentoricama, profesorici Alenki Mozer z Gimnazije Vič in doktorici Taji Železnik Ramuta s Kemijskega inštituta.

Še posebej bi se radi zahvalili profesorici Alenki Mozer, ki nama je dala priložnost za raziskovalno delo in nama pomagala razumeti njegov pomen. Najlepše se zahvaljujeva tudi Taji Železnik Ramuta, ker je spremljala najino laboratorijsko delo, naju usmerjala in spodbujala ves čas najinega raziskovalnega dela. Hvala tudi dr. Ivi Hafner Bratkovič in profesorju Romanu Jerali, ki sta nama omogočila delo na Odseku za sintezno biologijo in imunologijo na Kemijskem inštitutu.

7 VIRI

- Abaandou, L., Quan, D., & Shiloach, J. (2021). Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS10071667>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1). <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bösell, J., John, M., Freichel, M., & Blind, E. (2003). Signaling of the human calcium-sensing receptor expressed in HEK293-cells is modulated by protein kinases A and C. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, *111*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1055/S-2003-37496/ID/27/BIB>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 407–420). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Deng, Q., Wang, D., Xiang, X., Gao, X., Hardwidge, P. R., Kaushik, R. S., Wolff, T., Chakravarty, S., & Li, F. (2011). Application of a split luciferase complementation assay for the detection of viral protein-protein interactions. *Journal of Virological Methods*, *176*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.04.028>
- Dolberg, T. B., Meger, A. T., Boucher, J. D., Corcoran, W. K., Schauer, E. E., Prybutok, A. N., Raman, S., & Leonard, J. N. (2021). Computation-guided optimization of split

- protein systems. *Nature Chemical Biology*, 17(5). <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00729-8>
- El Karoui, M., Hoyos-Flight, M., & Fletcher, L. (2019). Future trends in synthetic biology—a report. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00175>
- Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E., & Michnick, S. W. (2002). β -Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein–protein interactions. *Nature Biotechnology* 2002 20:6, 20(6), 619–622. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-619>
- Haddock, S. H. D., Moline, M. A., & Case, J. F. (2010). Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science*, 2(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028>
- Hafner-Bratkovič, I. (2023). Inflammasome formation and triggers. In *Inflammasome Biology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91802-2.00006-2>
- Hirschi, S., Ward, T. R., Meier, W. P., Muller, D. J., & Fotiadis, D. (2022). Synthetic Biology: Bottom-Up Assembly of Molecular Systems. In *Chemical Reviews* (Vol. 122, Issue 21). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00339>
- Ji, J., Gu, W., Sun, C., Sun, J., Jiang, H., Zhang, Y., & Sun, X. (2016). A novel recombinant cell fluorescence biosensor based on toxicity of pathway for rapid and simple evaluation of DON and ZEN. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31270>
- Johnson, D. C., Taabazuing, C. Y., Okondo, M. C., Chui, A. J., Rao, S. D., Brown, F. C., Reed, C., Peguero, E., de Stanchina, E., Kentsis, A., & Bachovchin, D. A. (2018). DPP8/DPP9 inhibitor-induced pyroptosis for treatment of acute myeloid leukemia. *Nature Medicine*, 24(8). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0082-y>
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
- Kiselev, D., Matsvay, A., Abramov, I., Dedkov, V., Shipulin, G., & Khafizov, K. (2020). Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/v12020211>
- Kubelkova, K., & Macela, A. (2019). Innate Immune Recognition: An Issue More Complex Than Expected. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00241>
- Linder, A., Bauernfried, S., Cheng, Y., Albanese, M., Jung, C., Keppler, O. T., & Hornung, V. (2020). CARD8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. *The EMBO Journal*, 39(19). <https://doi.org/10.15252/embj.2020105071>
- Li, Y., Lv, J., Shi, W., Feng, J., Liu, M., Gan, S., Wu, H., Fan, W., & Shi, M. (2021). Inflammasome Signaling: A Novel Paradigm of Hub Platform in Innate Immunity for

- Cancer Immunology and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12, 710110. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.710110/BIBTEX>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. In *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications - A review. In *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Ozer, T., Geiss, B. J., & Henry, C. S. (2020). Review—Chemical and Biological Sensors for Viral Detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3). <https://doi.org/10.1149/2.0232003jes>
- Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2021). Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 21, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0391-5>
- Paulmurugan, R., & Gambhir, S. S. (2005). Firefly Luciferase Enzyme Fragment Complementation for Imaging in Cells and Living Animals. *Analytical Chemistry*, 77(5), 1295. <https://doi.org/10.1021/AC0484777>
- Ribeiro, B. V., Cordeiro, T. A. R., Oliveira e Freitas, G. R., Ferreira, L. F., & Franco, D. L. (2020). Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. In *Talanta Open* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100007>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 18). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Wang, Q., Gao, H., Clark, K. M., Mugisha, C. S., Davis, K., Tang, J. P., Harlan, G. H., DeSelm, C. J., Presti, R. M., Kutluay, S. B., & Shan, L. (2021). CARD8 is an inflammasome sensor for HIV-1 protease activity. *Science*, 371(6535). <https://doi.org/10.1126/science.abe1707>
- Winsor, N., Krustev, C., Bruce, J., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2019). Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells. In *Cellular Microbiology* (Vol. 21, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/cmi.13079>
- Zephyr, J., Kurt Yilmaz, N., & Schiffer, C. A. (2021). Viral proteases: Structure, mechanism and inhibition. In *Enzymes* (Vol. 50). <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2021.09.004>

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. In *Cell Discovery* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>