

IGEM ATHENS 2018: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ TOEHOLD SWITCHES ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ MERS-CoV

Ι. Ντέκας¹, Μ. Λίτσα^{1,2,3}, Β. Κρόκος¹, Ξ. Λ. Κατωπόδη¹, Ε. Κανάτα¹, Ν. Μπαρτζώκα¹, Ε. Κωσταδήμα¹, Σ. Κοτζαστράτης⁴, Π. Σπαθάρας⁵, Ε. Τόπακας¹, Π. Φωκά^{2,3*}

¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

²Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, ΕΙΠαστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

²Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Ανοσοβιοτεχνολογίας, ΕΙΠαστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

⁴Τμήμα Πληροφορικής, ΟΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

⁵Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

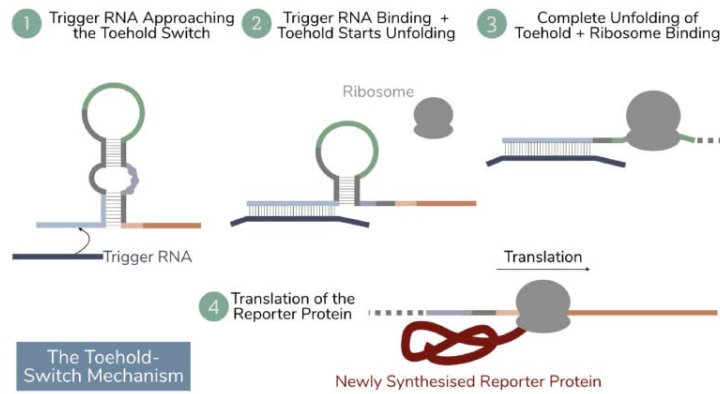
(*pfoka@pasteur.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κορονοϊός MERS(MERS-CoV) προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα με ποσοστό θνησιμότητας 35% και συγκαταλέγεται μεταξύ των πιθανότερων παραγόντων για πρόκληση μελλοντικής επιδημίας. Σε μια προσπάθεια ενίσχυσης των υπάρχοντων μέτρων ελέγχου ως απάντηση σε πιθανές μελλοντικές εξάρσεις του ιού, η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη ενός εύχρηστου, αξιόπιστου και ασφαλούς, ταχέως τεστ για τη διάγνωση του MERS-CoV. Το προτεινόμενο διαγνωστικό κιτ, το οποίο προορίζεται για χρήση σε εγκαταστάσεις παρακλίνιου διαγνωστικού ελέγχου και εγκαταστάσεις μαζικού ελέγχου σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης, περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα υποσυστήματα για την επεξεργασία δειγμάτων, την ανίχνευση του ιού (βιοαισθητήρας) και την παραγωγή σήματος. Ο μηχανισμός ανίχνευσης βασίζεται σε συνθετικά μόρια mRNA με λειτουργία ριβοδιακόπτη τύπου “toehold switch”. Οι σχεδιασμένοι διακόπτες ρυθμίζουν την έκφραση της τρεχαλάσης, ενζύμου που υδρολύει το δισακχαρίτη τρεχαλόζη σε γλυκόζη ενεργώντας ως πρωτεΐνη μάρτυρας. Η έκφραση της τρεχαλάσης επιτρέπεται μόνο όταν ο ιός υπάρχει στο δείγμα. Έτσι, συνολικά, το ικό φορτίο στο δείγμα πυροδοτεί την παραγωγή γλυκόζης, η οποία μπορεί να μετρηθεί με ένα κοινό εμπορικό γλυκόμετρο, σηματοδοτώντας έτσι μια πρώτη διάγνωση. Η προτεινόμενη ροή εργασιών για την ανάπτυξη της παρούσας διαγνωστικής μεθόδου και του κιτ είναι εύκολα προσαρμόσιμη για την ανίχνευση άλλων ιών που απειλούν την παγκόσμια υγεία, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στους τομείς της ταξιδιωτικής ιατρικής και της διάγνωσης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

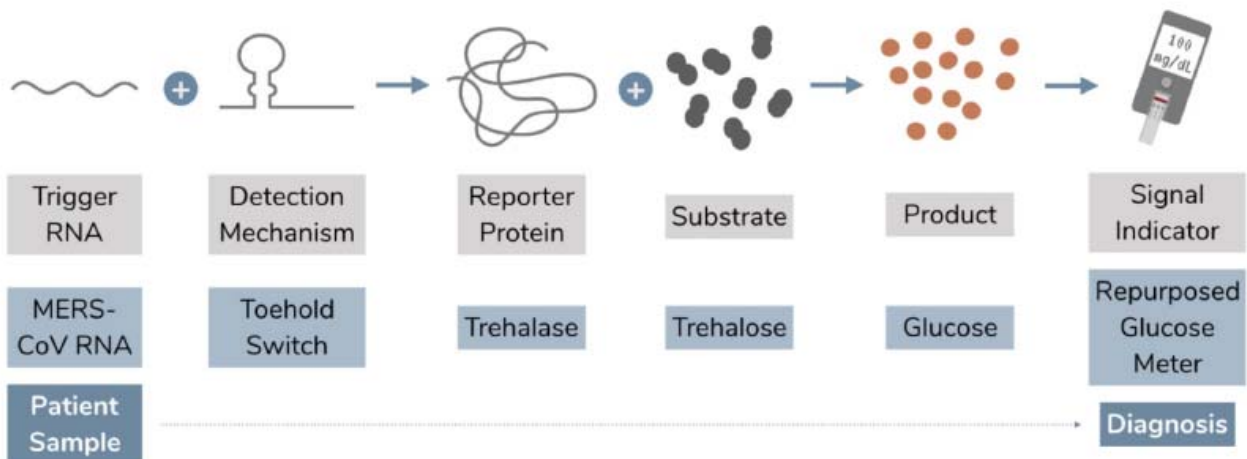
Ο ιός MERS-CoV (Middle - East Respiratory Syndrome Coronavirus) είναι κορονοϊός που προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα, με θνησιμότητα μεγαλύτερη του 35%. Ο μηχανισμός ανίχνευσης βασίζεται σε συνθετικά μόρια mRNA με λειτουργία ριβοδιακόπτη τύπου “toehold switch” και στοχεύει στην ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων RNA (RNA-στόχος) του ιικού γονιδιώματος, εξελικτικά συντηρημένων και χαρακτηριστικών για το προς ανίχνευση στέλεχος^[1]. Οι ριβοδιακόπτες, σχήματος φουρκέτας, ελέγχουν την μετάφραση μιας πρωτεΐνης μάρτυρα. Η μετάφραση της πρωτεΐνης μάρτυρα εξαρτάται από τη στερεοδιάταξη του ριβοδιακόπτη, λαμβάνοντας χώρα μόνο κατόπιν πρόσδεσης του RNA-στόχου σε συγκεκριμένη συμπληρωματική αλληλουχία του διακόπτη^[2]. Στην παρούσα εργασία ως πρωτεΐνη μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο τρεχαλάση (διάσπαση τρεχαλάσης σε γλυκόζη), έχοντας σαν τελική επιδίωξη την σύνδεση των τελικών επιπέδων γλυκόζης με την παρουσία ιού σε ένα δείγμα.



Σχήμα 1. Ο μηχανισμός του ριβοδιακόπτη Toehold-Switch.

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η ανάπτυξη καινοτόμου μεθόδου μοριακής διάγνωσης για την ανίχνευση του ιού MERS-CoV. Σε αυτή την κατεύθυνση, προτάθηκε η χρήση της βακτηριακής τρεχαλάσης ως πρωτεΐνης μάρτυρα (Trehalase A_(a-b)) καθώς και εναλλακτικά τμήματος αυτής (TreA-a). Στη δεύτερη περίπτωση η παραγωγή σήματος προϋποθέτει την ένωση του παραγόμενου τμήματος TreA-a με το τμήμα TreA-b η οποία καθίσταται εφικτή μέσω αλληλεπιδράσεων συμπληρωματικών αμινοξικών αλληλουχιών μοτίβου “φερμουάρ λευκίνης”^[3,4]. Παράλληλα επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός φορητού εξοπλισμού για ενσωμάτωση της μεθόδου και αξιοποίησή της σε εφαρμογές παρακλινικής διάγνωσης και εφαρμογές ταξιδιωτικής ιατρικής^[2,5]. Το προτεινόμενο διαγνωστικό κιτ περιέχει το μηχανισμό ανίχνευσης στο εσωτερικό του, λυοφιλιωμένο σε μορφή DNA μαζί με άλλα απαραίτητα αντιδρώντα και ανενεργό σε χάρτινα δισκία. Η ενεργοποίηση επέρχεται με την προσθήκη δείγματος και ενυδάτωση του δισκίου. Η διάγνωση γίνεται με τη χρήση εμπορικού μετρητή σακχάρου.



Σχήμα 2. Επισκόπηση του μηχανισμού ανίχνευσης του ιού MERS-CoV με τη χρήση ριβοδιακόπτη toehold switch ως βιοσένσορα και του μετρητή σακχάρου για τη λήψη του τελικού σήματος και τη διάγνωση.

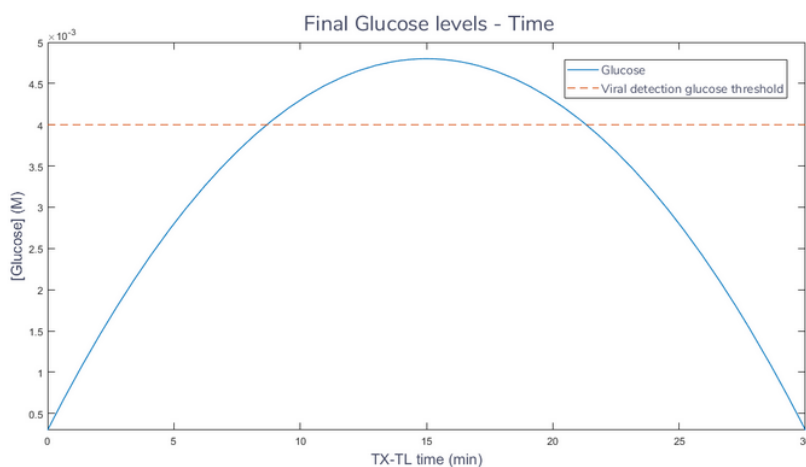
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο σχεδιασμός της δομής και η προσομοίωση της λειτουργίας των ριβοδιακοπών έγινε μέσω εργαλείων βιοπληροφορικής. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής και συνθετικής βιολογίας. Για την αξιολόγηση της μεθόδου, η τρεχαλάση εκφράστηκε σε cell-free

σύστημα, παρουσία υποστρώματος, και ακολούθησε προσδιορισμός των τελικών επιπέδων γλυκόζης στο διάλυμα. Ο σχεδιασμός του κιτ βασίστηκε σε υπολογίσιμες προσομοιώσεις της κινητικής των αντιδράσεων ενώ η επιλογή των υλικών και η γεωμετρία του αξιολογήθηκε με προσομοιώσεις της θερμοκρασιακής κατανομής ως προς το χρόνο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

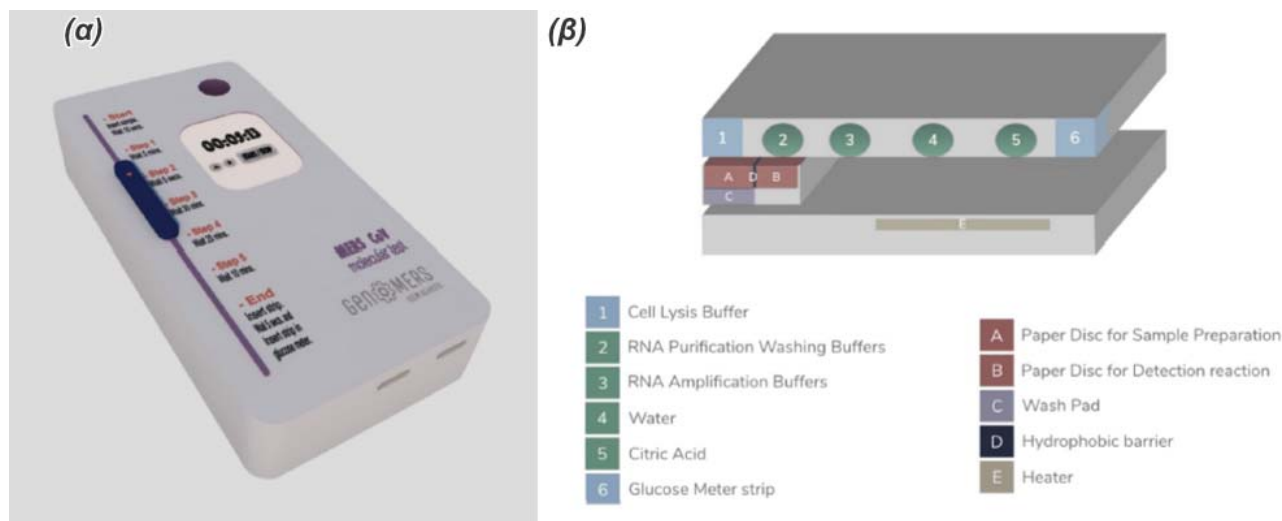
Αναπτύχθηκε εργαλείο βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη των βέλτιστων αλληλουχιών toehold-switch που αντιστοιχούν σε trigger RNAs προερχόμενα από περιοχή του ιικού γονιδιώματος, εξελικτικά συντηρημένη μεταξύ των ιικών στελεχών, που αποτελεί στόχο της RT-PCR αντίδρασης ανίχνευσής του. Επιλέχθηκαν και σχεδιάστηκαν τα τέσσερα ζεύγη ριβοδιακοπών/trigger RNA με τον βέλτιστο συνδυασμό θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών και η λειτουργικότητά τους ελέγχθηκε *in silico*. Το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της βακτηριακής τρεχαλάσης εκφράστηκε σε cell-free σύστημα και κατόπιν προσθήκης υποστρώματος τρεχαλόζης τα επίπεδα γλυκόζης ελέγχθηκαν με δοκιμασία DNS και Glucotest strips. Διαπιστώθηκε ότι 1 ώρα cell-free μεταγραφής-μετάφρασης (TX-TL) είναι αρκετή για να προσδώσει ορατή χρωματική αλλαγή με τη μέθοδο DNS ενώ ο προσδιορισμός με τον εμπορικό μετρητή σακχάρου κατέστη εφικτός για διαλύματα αντιδράσεων διάρκειας μεγαλύτερης της μιας ώρας. Οι προδιαγραφές του κιτ καθορίστηκαν από τις ανάγκες που προκύπτουν σε μια εφαρμογή παρακλινικής διάγνωσης. Ο *in silico* έλεγχος του τελικού σχεδιασμού πρότεινε ότι ένα κιτ βασισμένο στο μηχανισμό “toehold switch” και τελικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης με μετρητή σακχάρου μπορεί να παρέχει αποτέλεσμα εντός της μιας ώρας.



Σχήμα 3. Τελικά επίπεδα γλυκόζης ως προς το χρόνο του βήματος TX-TL ως αποτέλεσμα της κινητικής μελέτης του συστήματος. Το βήμα TX-TL ακολουθείται από την ενζυμική υδρόλυση της τρεχαλόζης σε γλυκόζη. Τα δύο βήματα έχουν συνολική διάρκεια 30 min. Το σενάριο κατά το οποίο το TX-TL στάδιο διαρκεί 20 min και το ενζυμικό 10 min παρέχει επίπεδα γλυκόζης άνω του τιθέμενου κατωφλιού ανίχνευσης $4 \cdot 10^{-3}M$ τελική γλυκόζη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν ριβοδιακόπτες τύπου “toehold switch” με πρωτεΐνη μάρτυρα TrcA για την ανίχνευση ολιγονουκλεοτιδίων RNA, τμημάτων του ιικού γονιδιώματος του MERS-CoV. Ο προτεινόμενος σχεδιασμός κρίνεται κατάλληλος και πολλά υποσχόμενος για εφαρμογές παρακλινικής διάγνωσης τόσο για τον συγκεκριμένο ιό όσο και για άλλους ιούς και ασθένειες με χαρακτηριστικά γενετικά αποτυπώματα.



Σχήμα 4. (α) 3D άποψη και (β) κάθετη τομή του προτεινόμενου διαγνωστικού κιτ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του διεθνούς διαγωνισμού συνθετικής βιολογίας «iGEM 2018» στον οποίο η ομάδα iGEM Athens 2018 κατατάχθηκε στη χάλκινη κατηγορία. Οι συγγραφείς εκφράζουν θερμές ευχαριστίες προς το Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας και το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Ανοσοβιοτεχνολογίας του ΕΙΠαστέρ για τη διεξαγωγή του κύριου όγκου των πειραμάτων. Οι συγγραφείς εκφράζουν επίσης θερμές ευχαριστίες προς τους χορηγούς της ομάδας.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] De Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier RAM. (2013). *J. Virol.*, 87(14): 7790–7792.
- [2] Pardee K, Green AA, Ferrante T, Cameron DE, Keyser AD, Yin P, Collins JJ. (2014). *Cell*, 159(4): 940–954.
- [3] Drikkic M, De Buck J. (2018). *Biotechnol. Bioeng.*, 155(5): 1128--1136.
- [4] Aronsson C, Staffan D, Feng Z, Per Ö, Karin E, Haibin S, Aili D. (2015). *Sci. Rep.*, 5(1): 14063.
- [5] Connelly JT, Rolland JP, Whitesides GM. (2015). *Anal. Chem.*, 87 (15), 7595-7601.