



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00687**

(22) Data de depozit: **27/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOCHIMIE AL
ACADEMIEI ROMÂNE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI 296, SECTOR
6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **CHIRITOIU- BUTNARU MARIOARA,
STR.TÂRGU-NEAMȚ, NR.13, BL.M2B8/2,
SC.B, ET.5, AP.67, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CHIRITOIU GABRIELA,
STR.CERNAVODĂ, NR.1, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GHENEA SIMONA, STR.DUNEI NR.17,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ISVORANU GHEORGHITA, STR.URANUS,
NR.102-104, BL.A7, SC.B, ET.1, AP.40,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **LINEIE CELULARĂ REPORTER PENTRU TESTAREA
ACTIVITĂȚII UNOR MODULATORI AI SINTEZEI
ȘI SECREȚIEI PROTEINEI INTERLEUKINEI-1 β**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de utilizare a unei linii celulare reporter pentru testarea activității unor modulatori ai sintezei și secreției proteinei interleukina-1beta (IL-1 β), asociată cu procese celulare inflamatorii. Metoda, conform invenției, constă în etapele: producerea unei linii celulare modificată genetic, denumită MP-IL-1 β :HiBiT, derivată din linia celulară de macrofage imortalizată J774A.1 (ATCC nr. cat: TIB-67) capabilă să producă proteina IL-1 β biologic activă marcată cu peptida HiBiT, inducția celulelor macrofage editate cu diverși stimuli, cum sunt cel de sinteză Lipopolizaharid

(LPS) și de secreție, adenzin trifosfat (ATP), detectarea și monitorizarea interacțiunilor moleculare ce modulează expresia proteinei IL-1 β prin măsurarea semnalului de luminiscentă al HiBiT, astfel că determinarea semnalului servește ca raportor pentru evaluarea/cuantificarea rapidă a modificărilor abundenței IL-1 β în celule macrofage și implicit a secreției acestora.

Revendicări: 6
Figuri: 12



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2022 0684
Data depozit 2.7.-10.- 2022.....

63

Descriere

Titlu: Linie celulară reporter pentru testarea activității unor modulatori ai sintezei și secreției proteinei interleukinei-1 β

Introducere

Această invenție se referă la utilizarea unei linii celulare modificată genetic, denumită MP-IL-1 β ::HiBiT, derivată din linia celulară de macrofage imortalizată J774A.1 (ATCC nr. cat: TIB-67), capabilă să producă proteina interleukina-1 β (IL-1 β) biologic activă marcată cu peptida HiBiT. Natura liniei celulare MP-IL-1 β ::HiBiT îi permite să fie utilizată în aplicații de screening cu randament ridicat pentru modulatori/inhibitori ai secreției de IL-1 β , pentru identificarea unor ținte terapeutice cu potențial reglator al răspunsului imun și inflamator.

Inflamația este o caracteristică a multor patologii frecvente și aparent neînrudite, cum ar fi: artrita reumatoidă (RA), ateroscleroza, cancerul, tulburările auto-inflamatorii, diabetul de tip 2, precum și anumite maladii neurodegenerative, inclusiv bolile Parkinson și Alzheimer. Acest lucru se datorează, în general, activării excesive a macrofagelor circulante sau rezidente în țesut care secretă mediatori pro-inflamatori care, la rândul lor, susțin procesele inflamatorii. Studiile efectuate în ultimele decenii au evidențiat căile complexe de semnalizare intracelulară precum cele mediate de: ciclo-oxigenaza 1 și 2 (COX-1/2), protein kinazele activate cu mitogen (MAPK), proteina janus tirozin kinaza (JAK), factorul de transcripție nucleară (NF-kB), citokine pro-inflamatorii și proteine reglatoare precum: IL-1/6, TNF α , MIF, IFN γ , MMP, care susțin procesele inflamatorii în condiții homeostatice cât și patologice (Bakhle YS et al. 1996).

Cele mai multe terapii antiinflamatorii se bazează în principal pe medicamente nesteroidiene și inhibitori care vizează metabolismul prostaglandinelor ca mijloace de a reduce disponibilitatea mediatorilor inflamatori și, astfel, de a controla inflamația sistemică. Cu toate acestea, multe dintre aceste medicamente au efecte secundare nedorite, prin urmare identificarea unor molecule eficiente pentru a controla inflamația cu efecte secundare minime este un obiectiv major al cercetărilor în domeniu (Braun J et al. 2019).

IL-1 β este cea mai potentă citokină pro-inflamatoare secretată de macrofagele activate ca răspuns la factori ce activează sistemul imun. Aceasta citokină este implicată în inițierea unui răspuns inflamator, îndepărtarea țesutului deteriorat și declanșarea regenerării tisulare ca răspuns la infecția cu agenți patogeni sau diverse leziuni. IL-1 β este sintetizată în citoplasma macrofagelor ca moleculă precursoră (*proIL-1 β*) în urma expunerii la „molecule pericol” din categoria modele moleculare asociate patogenului (PAMP-pathogen associated molecular patterns) sau modele moleculare asociate leziunii (DAMP-damage-associated molecular patterns) care activează calea de semnalizare mediată de TLR (receptorii Toll-like)-NF-kB. Un al doilea stimul, cum ar fi eliberarea de ATP din mitocondriile deteriorate, este necesar pentru a declanșa asamblarea inflamazomilor și auto-activarea caspazei-1. Caspaza-1 activată scindează *proIL-1 β* pentru a produce forma matură (*mIL-1 β*), care este exportată în spațiul extracelular pentru a perpetua inflamația (Eder C. 2009).

62

Domeniul invenției

Această invenție se referă la domeniul instrumentelor celulare pentru detectarea sintezei și secreției de proteină IL-1 β activă biologic, asociată cu procesele celulare inflamatorii și care poate fi utilizată în scopuri diverse precum cercetarea și industria farmaceutică.

Contextul invenției

IL-1 β este un membru al familiei de citokine IL-1 care joacă un rol central în reglarea răspunsului imun și inflamator la infecții sau leziuni. Activarea IL-1 β a fost implicată în activarea celulelor T ajutoare, stimularea producției de prostaglandine sau colagenază, chemotaxia neutrofilelor, activarea proteinelor de răspuns la patogeni în fază acută și suprimarea nivelului de fier plasmatic. IL-1 β este sintetizată ca o proteină precursor, care este scindată proteolitic într-o moleculă mai scurtă, activă, numită proteină matură. Forma precursor a IL-1 β este sintetizată numai ca răspuns la un stimul și nu are o peptidă semnal specifică pentru procesare și secreție. Exprimarea precursorului IL-1 β în macrofage și celulele dendritice este indusă de factorul de transcripție NF- κ B după expunerea celulelor imune înăscute la alarmine.

În consecință, este nevoie de o nouă abordare pentru detectarea și cuantificarea rapidă a proteinei IL-1 β , care ar trebui să permită identificarea ușoară și fiabilă a modulatorilor activității pro-inflamatorii a IL-1 β asociată cu diverse patologii.

Descrierea detaliată a invenției

În această invenție descriem linia celulară modificată genetic IL-1 β ::HiBiT și metoda care facilitează procedura de screening a modulatorilor/inhibitorilor IL-1 β . Obținerea și performanța prezentei invenții sunt descrise în exemplele prezentate mai jos.

Cuantificarea nivelului secretat al IL-1 β este o metodă valoroasă pentru a identifica modulatorii activității IL-1 β , cum ar fi activatori/inhibitori ai expresiei genei IL-1 β , modulatori ai procesării proteinei, sau modulatori ai secreției proteinei mature. Modularea activității IL-1 β de către diverși analiți este în prezent monitorizată prin metoda ELISA sau Western Blotting, care sunt capabile să măsoare variații în nivelul proteinei IL-1 β , dar ambele proceduri sunt laborioase și consumatoare de timp, nefiind potrivite pentru căutări la scară largă de modulatori ai proteinei IL-1 β (screening-uri de tip high-throughput). Prin urmare, noua linie celulară MP-IL-1 β ::HiBiT conform prezentei invenții reprezintă un instrument care necesită un timp scurt pentru identificarea rapidă și precisă a modulatorilor IL-1 β prin detectarea și cuantificarea semnalului de luminescență al proteinei IL-1 β ::HiBiT folosind trusa de detecție: „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” (Promega Corporation) disponibilă comercial.

Metoda descrisă în brevetul internațional WO 2021/108765 A1 prezintă secvențele compozite și metoda de generare a semnalului de bioluminescență în urma interacțiunii dintre trei componente ale sistemului de detectare HiBiT, care reprezintă o etapă în metoda de detecție a semnalului de luminescență HiBiT din prezenta invenție. Prin urmare, conform acordului Promega Corporation, prezenta invenție poate fi utilizată numai cu sistemele de detecție „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” și „Nano-Glo HiBiT Blotting System” (Promega, număr catalog: N2420 respectiv N2410). Mai mult, invenția exclude utilizarea acestei linii celulare în scopuri industriale sau comerciale fără acordul Promega Corporation.

„Linia celulară” conform prezentei invenții se referă la genotipul homozigot care exprimă peptida HiBiT fuzionată cu produsul genei IL-1 β endogene (IL-1 β ::HiBiT).

Experimentele prezentate aici demonstrează că linia celulară este capabilă să exprime IL-1 β :: HiBiT într-o manieră robustă și sensibilă la inducție cu diverși stimuli, precum cel de sinteză Lipopolizaharid (LPS) (EnzoLifeSciences, număr catalog: ALX-581-007-L002) și adozintrifofat (ATP) (Cayman Chemical, număr catalog: 14498), care activează caspaza-1 capabilă să cliveze forma *pro*IL-1 β sintetizată și să producă forma matură (*m*IL-1 β) secretată în mediu.

Conform strategiei generale furnizate, linia celulară poate fi utilizată în scopul detectării și monitorizării interacțiilor moleculare dintre IL-1 β și analiți (de exemplu, IL-1 β -molecule mici, IL-1 β -peptide, IL-1 β -anticorpi). O astfel de linie celulară poate fi utilizată pentru a investiga efectul inhibitorilor asupra procesării proteolitice și secreției proteinei IL-1 β . Semnalul de luminescență al HiBiT este modulată de către interacția IL-1 β -analit. Modularea (creșterea sau scăderea) semnalului de luminescență servește ca raportor pentru activarea sau inhibarea activității IL-1 β de către analit.

Prezenta invenție este descrisă în continuare prin următoarele exemple și figuri, care nu sunt intenționate ca limitări ale scopului invenției.

Exemplul 1 Obținerea liniei celulare de macrofage MP-IL-1 β ::HiBiT prin CRISPR/Cas9 knock-in

Celulele macrofage J774A.1 au fost editate folosind tehnologia CRISPR/Cas9 knock-in pentru a exprima peptida HiBiT fuzionată la capătul C-terminal al proteinei IL-1 β endogenă separată de un spațiator format din 5 resturi de glicină-serină (GGSGG) (Figura 1). Descrierea obținerii semnalului luminos produs conform prezentei invenții ca urmare a stimulării celulelor macrofage MP-IL-1 β ::HiBiT editate este prezentată schematic în (Figura 2). Trei ghiduri ARN (ARNg): Secv ID nr. 1, Secv ID nr. 2, Secv ID nr. 3 și două matrițe ADN donor (ADNd): Secv ID nr. 4, Secv ID nr. 5 au fost testate pentru ghidarea proteinei Cas9 la locusul IL-1 β și, respectiv, repararea clivajului ADN-ului produs de acțiunea proteinei Cas9 (Figura 3). Secvențele ARNg specifice pentru gena IL-1 β au fost proiectate folosind programul Chop-Chop (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), fiind selectate cele aflate în apropierea codonului STOP.

Pentru generarea liniei celulare control (CTRL), a fost utilizată o secvență ARNg sintetică (ARNgs) care nu prezintă omologie față de genomul celulelor macrofage (Secv ID nr 6). Matrițele ADNd au fost proiectate astfel încât secvența ADN codificatoare pentru Spațiator:HiBiT să conțină la ambele capete câte 56 (D2) și respectiv 45 (D3) polinucleotide omoloage capătului C-terminal al genei IL-1 β . ARN CRISPR (ARNcr), ARN trans activator al CRISPR (ARNtracr) fluorescent (numar catalog: 1075927) și ADNd au fost sintetizate folosind serviciul comercial de la Integrated DNA Technologies (IDT) și dizolvate în tampon Duplex (IDT) la o concentrație de 100 mM fiecare așa cum a fost descris anterior (Schwinn MK, 2018). Complexul de ARNg a fost preparat prin combinarea a 6 μ l de ARNcr cu 6 μ l de ARNtracr în 13 μ l de tampon Duplex (IDT) pentru a obține o concentrație finală de ARNg de 12 μ M. Amestecul a fost încălzit la 95°C timp de 5 minute și răcit la temperatura camerei după care 50 pmoli de enzimă Cas9 (numar catalog: 1081060) au fost amestecați lent cu 60 pmol ARNg

și lăsați să formeze complexe ribonucleoproteice (RNP) la temperatura camerei timp de 20 de minute.

Au fost testate 6 complexe RNP care corespund combinațiilor ARNg G7, G16, G23 și ADNd D2 și D3, notate G7D2, G7D3, G16D2, G16D3, G23D2 și G23D3 în Figura 4, în timp ce pentru obținerea liniei celulare control (CTRL) a fost testat complexul RNP (ARNGsD3) notat CTRL în Figura 4. Aproximativ 200000 de celule au fost electroporate cu un electroporator tip Neon (Thermo Scientific) într-un vârf de 10μL cu un mix de 5 μL RNP, 0,5 μL ADNd și 5.5 μL suspensie celulară în mediu Opti-MEM (Gibco, număr catalog: 31985-070). Celulele electroporate au fost transferate în vase cu aria suprafeței de 4cm, în 1 mL mediu DMEM (Gibco, număr catalog: 3196604) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (Gibco, număr catalog:10270-106) și au fost crescute la 37°C cu 5% CO₂ timp de 48 de ore. O parte din populația celulară heterogenă a fost recoltată la 48h pentru a verifica eficacitatea transfecției celor 6 complexe RNP prin genotipare PCR și respectiv măsurarea luminescenței generată ca urmare a secreției IL-1β::HiBiT după reînsămânțare și stimulare cu LPS și ATP (Figura 4A și B). Din restul de cultură celulară au fost stabilite populații clonale prin sortarea unei singure celule fluorescente în placi cu 96 godeuri folosind sorterul FACS Aria III (BD Bioscience).

Genotiparea prin PCR a fost realizată cu trusa de extracție a ADN-ului genomic (Bimake, număr catalog:B40015). Pentru aceasta, celule au fost spălate cu o soluție salină tampon fosfat (PBS) și resuspendate la o concentrație de aproximativ 200000 celule per 25 μL tampon de liză. Liza celulară a fost realizată prin incubare la 60°C timp de 30 min și 5 min la 95°C. Ulterior, 1 μL lizat celular a fost testat prin PCR utilizând secvențele amorsă sens și antisens, prezentate în Figura 3 (Secv ID nr. 7 și 8). Un fragment ADN de 284 perechi de baze, corespunzător inserției secvenței HiBiT a fost obținut după 42 de cicluri de amplificare cu denaturare la 95°C timp de 30 de secunde, atașarea amorselor la 60°C timp de 30 de secunde și extensie la 74°C timp de 10 secunde folosind amestecul 2x M-OptiMix din chitul Bimake (Figura 4A).

Expresia proteinei IL-1β::HiBiT a fost evaluată prin măsurarea semnalului de luminescență din lizate celulare folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” conform protocolului producătorului (Figura 4B). Mai exact celulele electroporate au fost înșămânțate, lăsate să adere 24h, după care au fost pre-stimulate pentru aproximativ 12h cu 0.5 mg/mL LPS. Stimularea secreției IL-1β::HiBiT, a fost realizată cu 0.5 mg/mL LPS și 2mM ATP în mediu OptiMEM, pentru 45 min. După aceasta, peste mediul celular a fost adăugat un volum egal de tampon extracelular Nano-Glo HiBiT suplimentat cu proteina LgBiT și substrat (conform indicațiilor producătorului). Luminescența emisă a fost citită la un spectrofotometru Mithras, LP 940. Valorile obținute au fost reprezentate grafic în softul GraphPad Prism v.6.0.

Din populația de celule G23D2 cu expresie heterogenă, au fost generate populații de celule clonale prin sortare specifică, respectiv distribuirea a câte 1 celulă fluorescentă în placă cu 96 de godeuri utilizând sorterul FACS Aria III. După expansiunea celulelor, clonele celulare au fost genotipate prin PCR pentru identificarea populațiilor homozigote (Figura 5A). Clona celulară C6 care prin genotipare s-a dovedit homozigotă din punct de vedere al inserției secvenței HiBiT a fost ulterior testată pentru luminescența generată după stimularea celulelor

cu LPS și LPS/ATP. Mai mult, corelația dintre numărul de celule și intensitatea luminescenței care se observă în Figura 5B indică o specificitate a semnalului luminescent detectat. Regiunea de inserție HiBiT din clona celulară C6 editată cu ARNhid G23 și matricea donor D2 a fost amplificată prin PCR și secvențiată pentru a confirma editarea. Rezultatele prezentate demonstrează că gena IL-1 β din clona celulară G23 D2 C6 a fost marcată cu peptida HiBiT cu succes (Figura 6A, B) și această clonă a fost utilizată pentru experimentele ulterioare și denumită MP-IL-1 β :: HiBiT.

Specificitatea luminescenței proteinei IL-1 β :: HiBiT a fost evaluată în macrofagele MP-IL-1 β :: HiBiT și linia CTRL prin ELISA utilizând anticorpi anti-IL-1 β specifici (Figura 7A) și trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” (Figura 7B). Astfel, doar în lizatele macrofagelor MP-IL-1 β :: HiBiT dar nu și în clona CTRL se observă un semnal luminescent generat de HiBiT, în timp ce anticorpii anti-IL-1 β recunosc atât proteina IL-1 β din linia CTRL cât și proteina IL-1 β :: HiBiT din linia celulară MP-IL-1 β :: HiBiT. Detecția prin metoda ELISA a fost realizată cu trusa specifică (R&D Systems, număr catalog DY401-05), conform recomandărilor producătorului. Pe scurt s-a format un sandwich între anticorpii IL-1 β specifici (capturare și detecție) și antigenul din probe, reprezentând mediul celular recoltat de la celulele CTRL și MP-IL-1 β :: HiBiT stimulate cu LPS și ATP sau nestimulate, alături de proteina standard (diluții seriale pornind de la 2000pg/mL). Complexul format a fost detectat cu substrat Streptavidină-HRP, densitatea optică generată fiind citită la 450nm. Valorile măsurate pentru diluțiile proteinei standard au fost folosite pentru generarea unei curbe standard polinomiale, pe baza căreia a fost generată o ecuație corespunzătoare. Valorile măsurate pentru probe au fost introduse în ecuația obținută și cantitățile specifice detectate au fost reprezentate grafic folosind Prism, GraphPad v.6.0.

Exemplul 2 Confirmarea inserării corecte a peptidei HiBiT doar în locusul IL-1 β

Pentru a confirma inserția peptidei HiBiT doar în locusul genomic anticipat, masele moleculare ale proteinelor din lizatele celulare și respectiv mediu celular au fost verificate prin WB folosind trusa de detecție “Nano-Glo HiBiT Blotting System”. Identitatea proteinei IL-1 β :: HiBiT prin Western Blotting a fost stabilită prin analiza mediului obținut ca urmare a stimulării cu LPS și ATP pentru 45 min, a celulelor MP-IL-1 β :: HiBiT pre-stimulate cu LPS pentru 12h sau nestimulate și a lizatului celular corespunzător. Lizatele au fost obținute prin incubarea timp de 30 min pe gheață cu tampon ce conține 1% TritonX100 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1% Triton-X100) suplimentat cu un cocktail de inhibitori ce țarghetează serin-cistein proteazele (Roche) și inhibitori specifici pentru fosfataze. Proteinele conținute în lizatele clarificate prin sedimentare la 14000xg, 30 min, alături de cele conținute în fracția de mediu au fost separate, în condiții reducătoare, în gel de poli-acrilamidă de concentrație 15%, transferat pe o membrană de nitroceluloză, cu pori de 0,22 μ m.

Membrana a fost incubată în soluție salină tampon Tris (TBS-50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl) suplimentat cu 0.1% Tween-20 (TBST), pentru 2-3 ore pentru solubilizarea și expunerea HiBiT. Ulterior, membrana a fost incubată peste noapte cu proteina LgBiT pentru formarea complexului HiBiT-LgBiT. Detecția a fost realizată prin adăugarea substratului specific, conform indicațiilor producătorului și apoi citit la sistemul ChemiDoc (GE Healthcare). Imaginile achiziționate arată că în lizatele celulare au fost detectate doar două benzi de 35 și respectiv 17 kDa, corespunzătoare proteinelor proIL-1 β ::HiBiT și mL-1 β ::HiBiT, demonstrând astfel că secvența HiBiT a fost inserată numai în locusul IL-1 β așa cum s-a

intenționat. Benzi cu aceleași mase moleculare au fost detectate și în mediul celular demonstrând în plus că marcarea HiBiT nu interferă cu procesarea și secreția IL-1 β din macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT editate, stimulate (Figura 8).

Exemplul 3 Corelația dintre intensitatea luminiscentei HiBiT și abundența proteinei IL-1 β ::HiBiT.

A fost verificată de asemenea capacitatea celulelor de a sintetiza, procesa și secreta IL-1 β ::HiBiT după stimularea secreției pentru intervalele de timp diferite prin WB folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Blotting System” (Figura 9A) și anticorpi specifici anti-IL-1 β (R&D Systems, număr catalog AF-401-NA) (Figura 9B). Pentru obținerea acestui set de probe, celulele MP-IL-1 β ::HiBiT, pre-stimulate pentru 12h cu LPS au fost stimulate cu LPS și ATP pentru 15, 30, 45 și 60 min. Mediile recoltate, alături de lizatele obținute conform procesării detaliate în Exemplul 2, au fost încărcate în geluri de poliacrilamidă în duplicat și apoi probele pentru detecția cu trusa „Nano-Glo HiBiT Blotting System” au fost transferate pe membrană de nitroceluloză iar cele pentru detecția cu anticorpi anti-IL-1 β au fost transferate pe membrană PVDF. Detecția cu trusa Nano-Glo HiBiT a fost realizată conform indicațiilor producătorului, descrisă pe scurt în Exemplul 2.

Detecția cu anticorpi anti-IL-1 β specifici a fost realizată prin incubarea membranei, pre-blocată cu o soluție 5% BSA în TBST pentru 1h, cu o diluție de anticorp IL-1 β , 1:1000, în soluție 5% BSA TBST) peste noapte, la 4°C. Anticorpii primari au fost recunoscuți de anticorpi secundari specifici cuplați cu peroxidaza din hrean, iar detecția proteinei a fost realizată prin citirea la ChemiDoc a semnalului chemiluminescent, generat de oxidarea substratului luminol (Immobilon Crescendo Western HRP substrate, Merck Millipore, număr catalog WBLUR0500). Analiza rezultatelor indică faptul că detecția folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Blotting System” este mai sensibilă decât cea folosind anticorpii specifici anti-IL-1 β .

Exemplul 4 Proteina IL-1 β ::HiBiT este procesată și traficată corect în macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT

De asemenea am analizat localizarea intracelulară și sensibilitatea de detecție a peptidei HiBiT prin microscopie de fluorescență folosind anticorpi specifici pentru HiBiT în paralel cu anticorpi specifici pentru IL-1 β (Figura 10). Pentru aceasta celulele MP-IL-1 β ::HiBiT au fost însămânțate pe suporturi speciale de sticlă și au fost lăsate să adere 24h. Celulele aderente au fost sau nu pre-stimulate cu LPS pentru 8h și stimulate cu LPS și LPS/ATP pentru 30min. Fixarea celulelor a fost realizată cu o soluție 1% paraformaldehidă în PBS, pentru 1h la temperatura camerei. Permeabilizarea s-a realizat prin incubare în soluție de 0.005% digitonină, 2% ser de cal în PBS timp de 3 minute, iar blocarea s-a realizat cu o soluție 2% ser de cal în PBS timp de 3 ore. Anticorpii primari anti-HiBiT (Clonă 30E5, Promega), anti-IL-1 β (R&D Systems, număr catalog AF-401-NA), au fost diluați în soluție 2% ser de cal în PBS și probele pe suporturi de sticlă au fost incubate cu anticorpii primari peste noapte la 4°C. Incubarea cu anticorpi secundari a fost realizată în soluție 2% ser de cal în PBS pentru 30 min la temperatura camerei. Nucleii au fost marcați prin incubare cu Hoechst 33342 (Santa Cruz Biotechnology, număr catalog: sc-495790) diluat 1/5000 în PBS. Excesul de Hoechst cât și anticorpii legați nespecific au fost înlăturați prin spălări repetate cu PBS. Probele au fost montate folosind FluorSave (Merk Millipore, număr catalog 345789).

Imagini reprezentative au fost achiziționate cu un Microscop Confocal (Zeiss), cu Obiectiv 63x, cu ulei de imersie. Prelucrarea imaginilor a fost realizată în Image J (NIH,

54

Bethesda) . Imaginile din Figura 10 arată un trafic nealterat al proteinei IL-1 β ::HiBiT, care împreună cu detecția în mediu a proteinei mature secretate IL-1 β ::HiBiT sugerează o reglarea dinamică a nivelului IL-1 β ::HiBiT și oferă un model adecvat pentru evaluarea/cuantificarea rapidă a modificărilor abundenței IL-1 β în celulele macrofage și implicit a secreției acesteia.

Exemplul 5 Modularea secreției proteinei IL-1 β ::HiBiT de către inhibitori ai secreției proteinei IL-1 β

Au fost efectuate experimente pentru a determina capacitatea liniei celulare MP-IL-1 β ::HiBiT de a răspunde la inhibitori cunoscuți care afectează secreția IL-1 β . Pentru aceasta, celulele MP-IL-1 β ::HiBiT au fost stimulate cu LPS și ATP conform descrierii din Exemplele anterioare, în prezența sau absența inhibitorului de caspază-1 (Ac-YVAD-CMK, 10 μ M). Detecția luminescenței relative utilizând trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System”, indică o scădere a secreției proteinei IL-1 β ::HiBiT în prezența inhibitorului de caspază-1 (Figura 11). Mai mult, valorile relative de luminescență obținute ca urmare a stimulării în prezența a diferite concentrații de inhibitor (2, 5 și 10 μ M) indică o scădere a secreției IL-1 β corelată cu concentrația de inhibitor de caspază-1 adăugat (Figura 12).

În concluzie, sistemul celular MP-IL-1 β ::HiBiT împreună cu trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” oferă o sensibilitate crescută pentru detecția secreției proteinei IL-1 β , potrivită pentru căutări la scara largă de modulatori ai activității proteinei IL-1 β .

Bibliografie:

- Bakhle YS, Botting RM, “Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation” *Mediators Inflamm.* 1996; 5(5):305-23.
- Eder C, “Mechanisms of interleukin-1 β release” *Immunobiology.* 2009; 214(7):543-53
- Braun J, Baraliakos X, Westhoff T, “Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk - a matter of indication” *Semin Arthritis Rheum.* 2019; pii: S0049-0172(19)30211-2
- Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K, Eggers CT, Dixon AS, Hurst R, Hall MP, Encell LP, Binkowski BF, Wood KV, „CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide” 2018, *ACS Chem Biol.* Feb 16;13(2):467-474.

Revendicări:

1. Componentele necesare obținerii liniei de celule macrofage modificată genetic în locusul IL-1 β .
2. O metodă de producere a unei inserții țintite în locusul IL-1 β din genomul celulelor macrofage.
3. Linie celulară modificată genetic pentru a produce proteina IL-1 β ::HiBiT activă biologic într-o manieră inductibilă, implementând astfel o linie celulară modificată genetic.
4. Linie celulară conform revendicării 3, în care IL-1 β ::HiBiT este secretată de celulă.
5. Linie celulară conform revendicării 3, în care IL-1 β ::HiBiT poate fi detectată din mediul extracelular cu o sensibilitate crescută față de detecția prin Western Blotting cu anticorpi specifici.
6. Metodă de screening a modulatorilor/inhibitorilor sintezei și secreției IL-1 β .

55

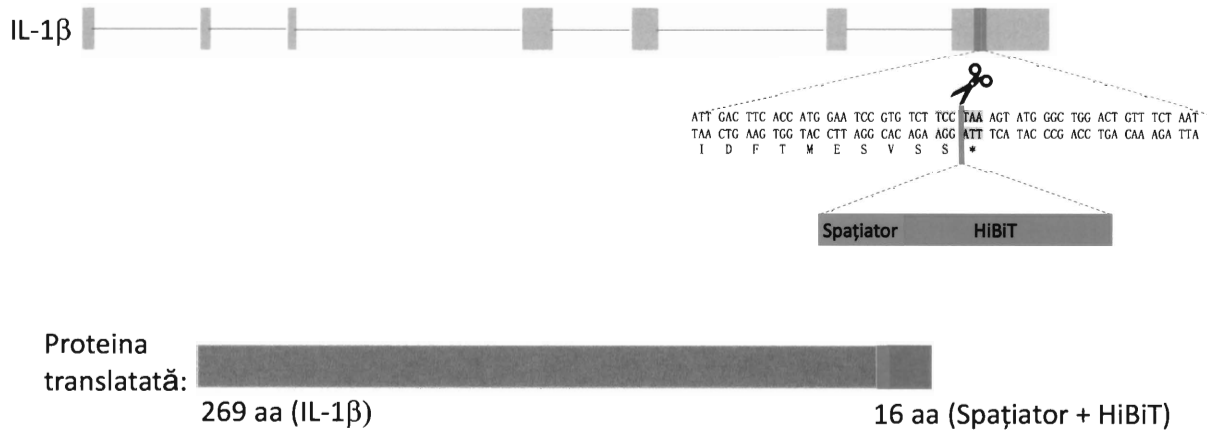


Figura 1. Ilustrare schematică care descrie poziția inserției peptidei HiBiT în locusul IL-1 β

54

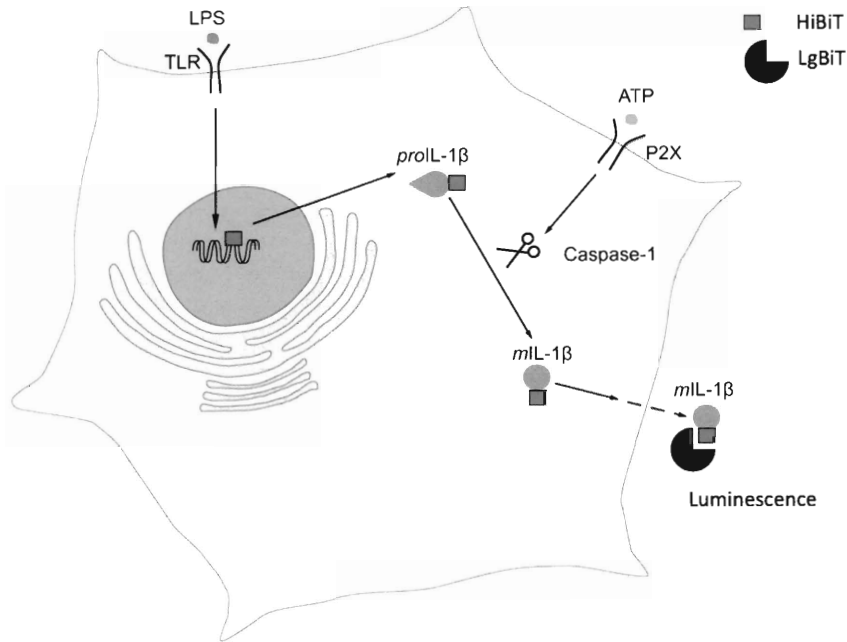


Figura 2. Etapele de sinteză, procesare și secreție ale proteinei IL-1 β țintită cu HiBiT utilizând tehnologia CRISPR/Cas9 knock-in

Secv ID nr 1: (ARNg G7) 5'- GCCCATACTTTAGGAAGACACGG

Secv ID nr 2: (ARNg G16) 5'- TCCGTGTCTTCCTAAAGTATGGG

Secv ID nr 3: (ARNg G23) 5'- TGTCTTCCTAAAGTATGGGCTGG

Secv ID nr 4: (D2) 5'-

AAAAGGGAGCTCCTAACATGCCCTGGGGAAGGCATTAGAAACAGTCCAGCCCATACTTTAGCTAATCTTC
TTGAACAGCCGCCAGCCGCTCACTCCACCTGAACCTCCGGAAGACACGGATTCCATGGTGAAGTCAATTAT
GTCCTGACCACTGTTGTTTCCCA

Secv ID nr 5: (D3) 5'-

ACATGCCCTGGGGAAGGCATTAGAAACAGTCCAGCCCATACTTTAGCTAATCTTCTTGAACAGCCGCCAGC
CGCTCACTCCACCTGAACCTCCGGAAGACACGGATTCCATGGTGAAGTCAATTATGTCCTGA

Secv ID nr 6: (ARNGs) 5'-TTTAGGGGGTTCGCGCTTAA

Secv ID nr 7: Amorsă sens: 5'- CTGGTACATCAGCACCTCACAAGC

Secv ID nr 8: Amorsă antisens: 5'- CTTGTGACCCTGAGCGACCTGTC

Figura 3. Lanțul de nucleotide pentru secvențele ARNg: G7, G16 și G23, ARNGs și ADNd: D2 și D3, precum și secvențele amorselor utilizate în reacțiile PCR

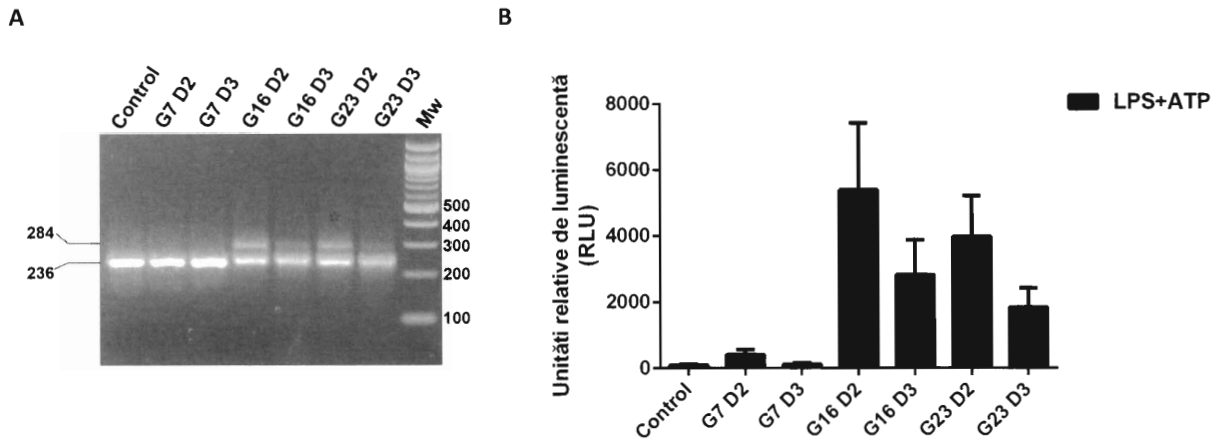


Figura 4. Analiza celulelor macrofage țintite cu complexe RNP indicate, după electroporare și expansiune. Panoul (A) prezintă genotiparea prin PCR a unor populații celulare nețintite și respectiv țintite (heterozigote), care au o alelă de tip sălbatic (WT) de 236 perechi de nucleotide și una țintită cu HiBiT de 284 perechi de nucleotide. Graficul din Panoul (B) prezintă semnalul de luminescență al populațiilor de celule cu fenotipul dorit, indicând o creștere a semnalului de luminescență ca răspuns al activării sintezei proteinei IL-1 β ::HiBiT

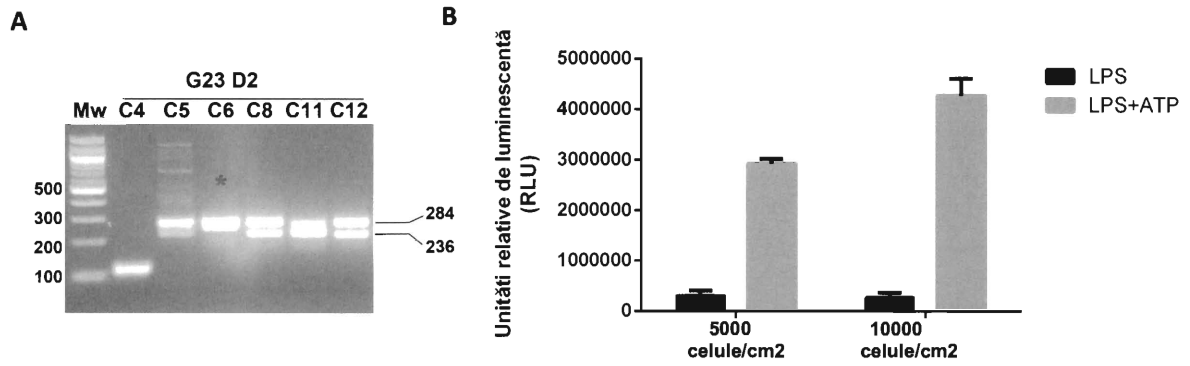
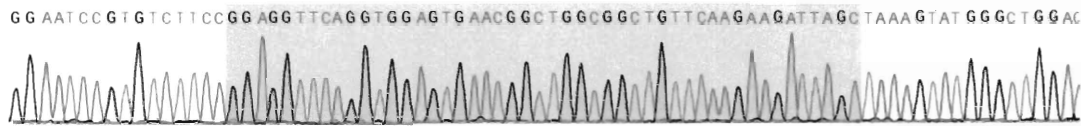


Figura 5. Selecția clonelor celulare MP-IL-1 β ::HiBiT homozigote derivate din celulele G23D2. Panoul (A) prezintă genotiparea clonelor celulare prin PCR. Doar clona C6 prezintă un genotip homozigot pentru inserția peptidei HiBiT în locusul IL-1 β . Graficul din panoul (B) prezintă semnalul de luminescență generat de proteina IL-1 β ::HiBiT din macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT cultivate la două densități celulare diferite și stimulate cu LPS și ATP

A



B

Spațiator
HiBiT

gaa tcc gtg tct tcc gga ggt tca ggt gga GTG AAC GGC TGG CGG CTG TTC AAG AAG ATT AGC taa agt atg ggc tgg
 E S V S S G G S G G V N G W R L F K K I S *

Figura 6. (A) Cromatograma secvențierii ADN extras din macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT care confirmă inserția secvenței ADN codificatoare pentru Spațiator::HiBiT în locusul IL-1 β . Secvența de polinucleotide Spațiator::HiBiT inserată înaintea codonului STOP (TAA) este evidențiată prin fundalul albastru. (B) Traducerea dedusă a capatului C-terminal al IL-1 β care indică prezența secvenței codificatoare pentru Spațiator::HiBiT în același cadru de citire cu al codonilor pentru IL-1 β .

49

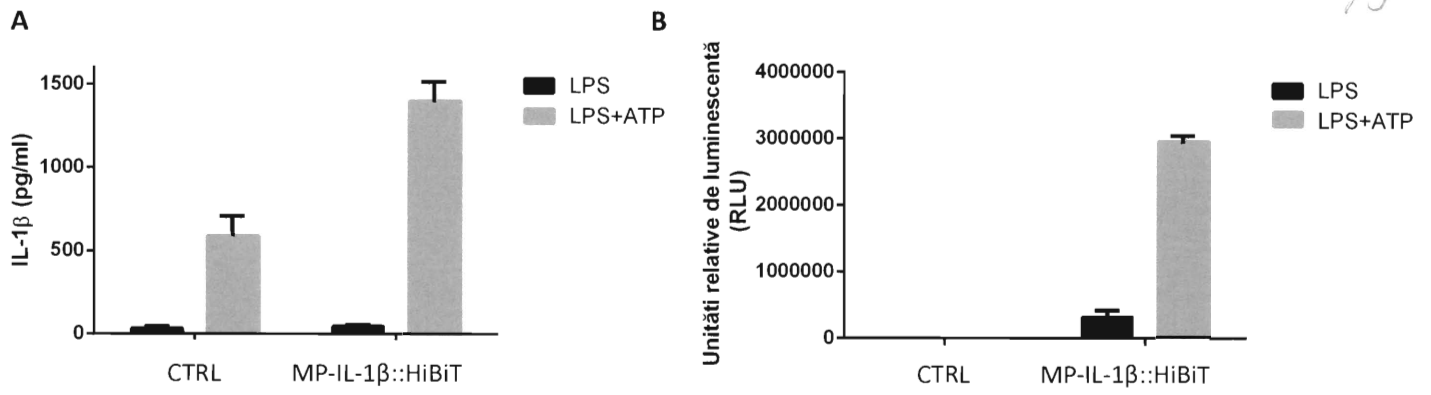


Figura 7. Detecția proteinei IL-1β:: HiBiT secretată de macrofagele MP-IL-1β:: HiBiT și respectiv macrofagele CTRL folosind trusa de detecție ELISA cu anticorpi specifici anti-IL-1β (panoul A) și folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” (panoul B)

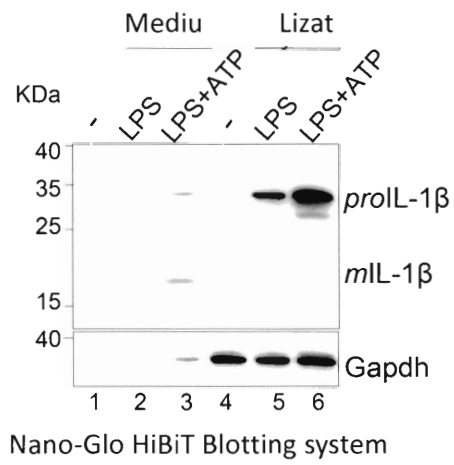


Figura 8. Analiza prin Western Blotting care demonstrează existența unor specii unice de proteine marcate cu HiBiT, corespunzătoare greutăților moleculare proIL-1 β ::HiBiT și mL-1 β ::HiBiT în macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT stimulate sau nu (-) cu LPS și ATP, folosind trusa de detecție "Nano-Glo HiBiT Blotting system"

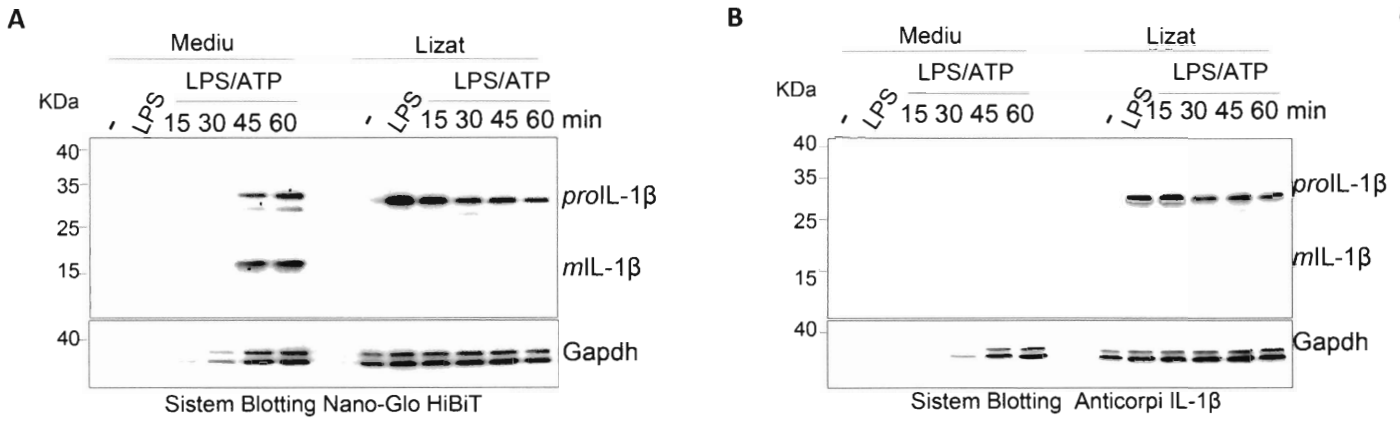


Figura 9. Detecția prin Western Blotting a nivelului de IL-1 β ::HiBiT folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System” în panoul (A) și anticorpi specifici anti-IL-1 β în panoul (B). Macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT au fost stimulate sau nu (-) cu LPS și ATP pentru intervalele de timp indicate

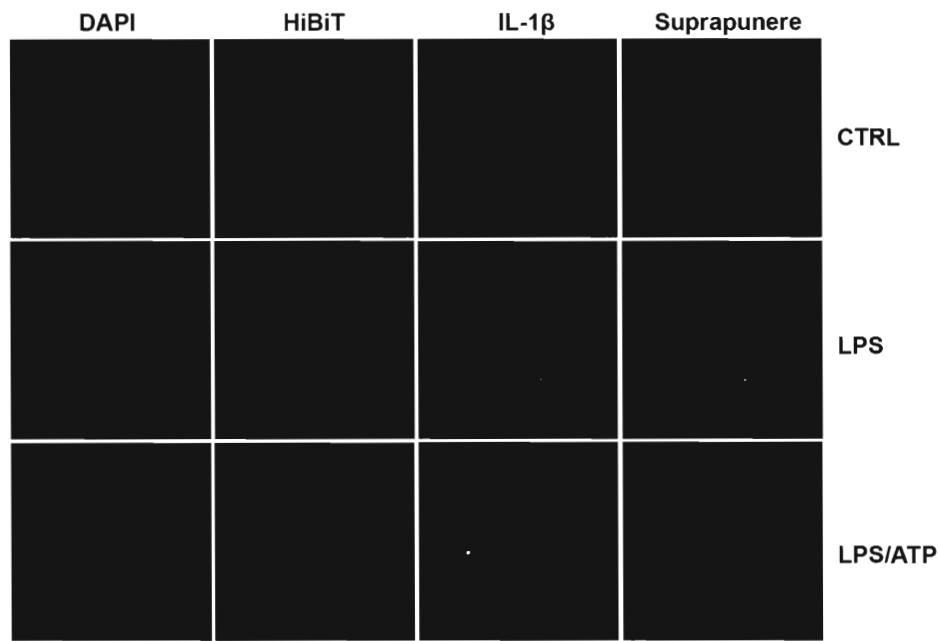


Figura 10. Distribuția subcelulară a proteinei IL-1β::HiBiT detectată cu anticorpi specifici anti-IL-1β și anti-HiBiT în macrofagele MP-IL-1β::HiBiT nestimulate (-) (rândul de sus), stimulate cu LPS (rândul din mijloc) și LPS/ATP (rândul de jos). Coloana 1 arată acizii nucleici detectați cu Hoechst, coloana 2 indică proteina IL-1β::HiBiT detectată cu anticorpi anti-HiBiT, coloana 3 indică proteina IL-1β::HiBiT detectată cu anticorpi anti-IL-1β, iar coloana 4 indică imaginile suprapuse ale acestora

65

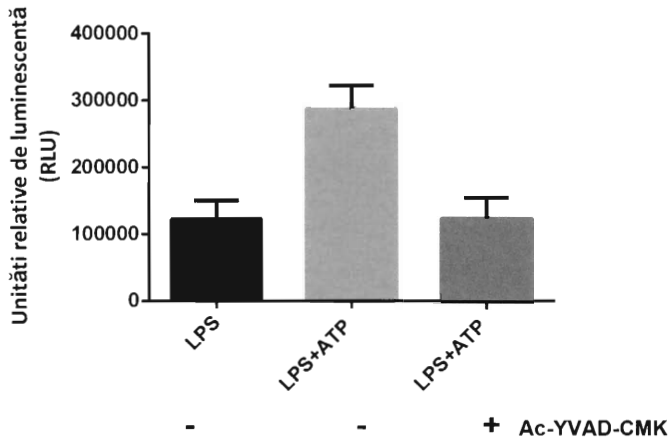


Figura 11. Inactivarea caspazei-1 de către un inhibitor specific (Ac-YVAD-CMK) suprimă secreția formei bioactive mIL-1 β ::HiBiT în mediu extracelular. Secreția mIL-1 β ::HiBiT a fost stimulată cu LPS și respectiv LPS+ATP în absența sau prezența inhibitorului iar detecția proteinei secretate mIL-1 β ::HiBiT a fost realizată cu „Nano-Glo HiBiT Extracellular Luminescence System”.

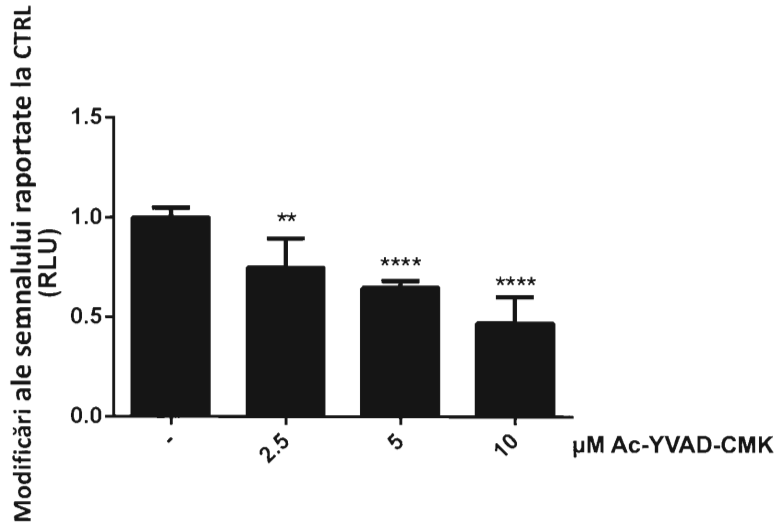


Figura 12. Analiza cantitativă a răspunsului la doze crescătoare ale inhibitorului caspază-1 (Ac-YVAD-CMK) folosind trusa „Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System”. Secreția proteinei mL-1 β ::HiBiT din macrofagele MP-IL-1 β ::HiBiT prestimulate cu LPS și stimulate cu LPS/ATP este direct proporțională cu concentrația de inhibitor folosită, indicând sensibilitatea liniei celulare față de modulatorii ai secreției proteinei mL-1 β ::HiBiT. Intensitatea semnalului reflectă concentrația mL-1 β ::HiBiT din mediu. Analiza statistică a fost realizată folosind testul “one-way ANOVA”