

Biosensor aktywności metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 / Matrix metalloproteinase 9 activity biosensor.

Abstrakt:

EN:

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is an extracellularly acting endopeptidase with a prominent role in development, learning and memory, cancer metastasis, and stroke. To assess the biological function of the proteinase, determination of the precise kinetics and localization of MMP-9 activity is required. The nontoxic, genetically-encoded biosensor presented herein utilizes the Förster resonance energy transfer phenomenon to detect MMP-9 activity and is anchored in the plasma membrane. The biosensor allows the study of the proteolytic activity of MMP-9 with high temporal and subcellular resolution at the precise region of MMP-9 action on the cell. Cleavage of the biosensor by exogenously applied auto-activating mutant of MMP-9 and endogenous MMP-9 was demonstrated by ratiometric analysis in vitro and in cultured tumor and neuronal cells. The precise kinetics of endogenous MMP-9 activity was measured, which demonstrates in a straight-forward manner the applicability of the biosensor concept. The activity of endogenous MMP-9 on single dendritic spines recorded with the biosensor confirms that high-resolution imaging of MMP-9 proteolytic activity is possible with the biosensor. Results of the analysis of the selectivity of the biosensor to MMP-9 cleavage using MMP-9 deficient animals are presented along with the in vivo delivery of the biosensor into the hippocampus with an adeno-associated virus-based vector.

PL:

Metaloproteaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) jest zewnątrzkomórkową endopeptydazą, pełniącą istotną rolę w rozwoju, uczenia się i pamięci, przerzutowania nowotworów oraz w zjawiskach patologicznych towarzyszących udarom. Poznanie biologicznych funkcji biologicznych tej proteazy oraz ustalenie lokalizacji aktywnej MMP-9 jest z tego powodu niezwykle ważne. Zaprezentowany w tej pracy biosensor jest genetycznie zakodowany oraz zakotwiczony w błonie komórkowej. Wykrywanie aktywności MMP-9 z jego udziałem opiera się na wykorzystaniu zjawiska rezonansowego przeniesienia energii Förstera. Biosensor nie jest toksyczny dla komórek, w których ulega ekspresji. Ponadto pozwala on na badanie i lokalizowanie aktywności proteolitycznej MMP-9 z wysoką rozdzielczością czasową i przestrzenną. Możliwość wykrycia aktywności egzogennej i endogennej MMP-9 przy pomocy przedstawionego biosensora potwierdzono in vitro oraz w hodowli komórkowej. Praca przedstawia również wyniki doświadczeń, których celem było wykrycie aktywności MMP-9 w obrębie pojedynczych kolców dendrytycznych, a także potwierdzenie specyficzności biosensora względem MMP-9. Omówiono także stworzenie wektorów wirusowych niosących gen kodujący biosensor oraz zastosowanie ich do ekspresji biosensora in vivo.