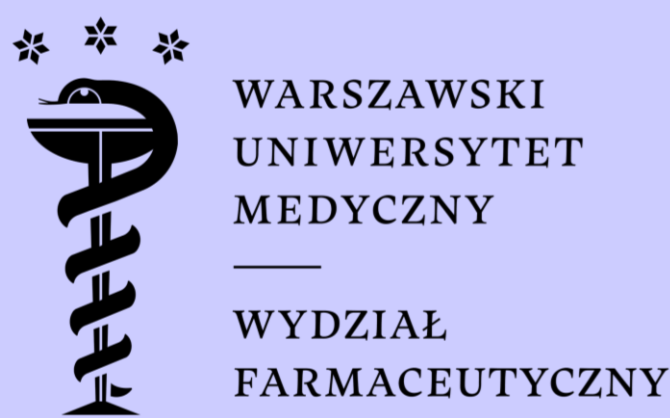
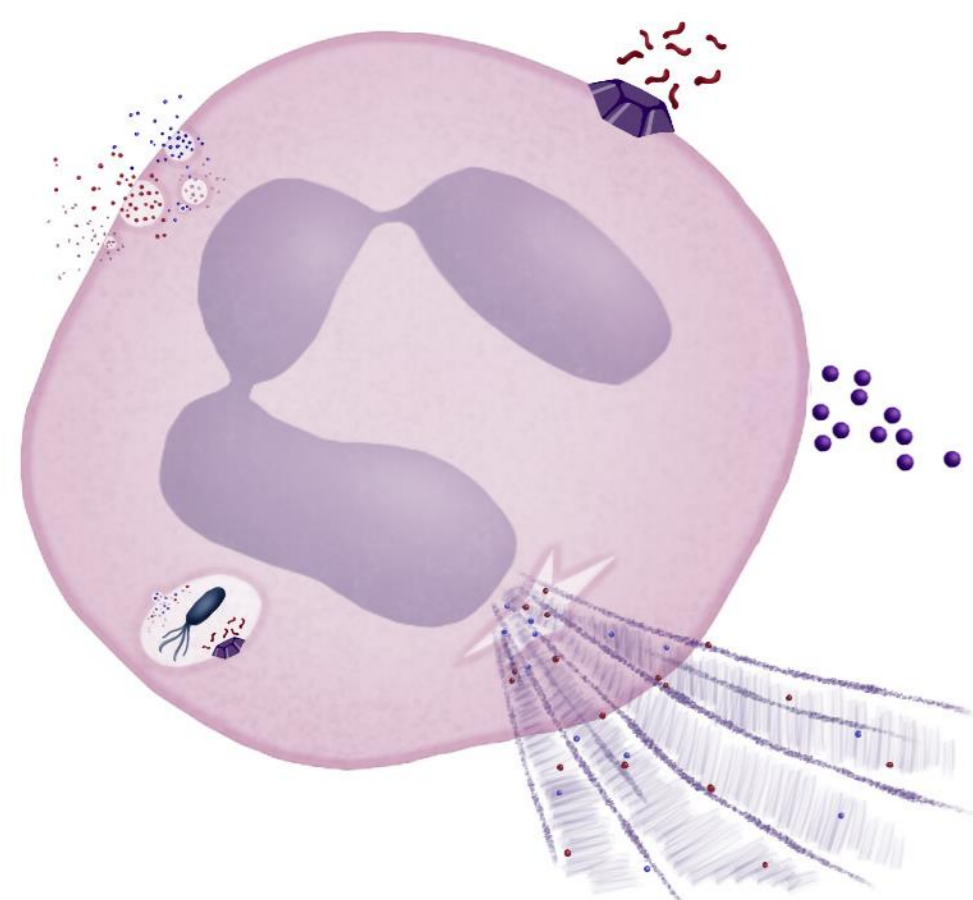


Stworzenie konstruktów zawierających sekwencję genu CEBPA, umożliwiającego różnicowanie komórek linii K562 w komórki granulocytopodobne



mgr Kasandra Kosman

Promotor: Dr n. med. i n. o zdr. Aneta Manda-Handzlik
Opiekun: Dr n. med. Małgorzata Wachowska



WPROWADZENIE

Neutrofile pełnią kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej organizmu dzięki szeroko wyspecjalizowanym funkcjom efektorowym. Ich żywotność w ludzkim krwiobiegu jest stosunkowo krótka. W zależności od źródła, ich okres półtrwania waha się między 8 a 24 godzinami. Jest to przyczyną trudności w prowadzeniu eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem manipulacji genetycznych.

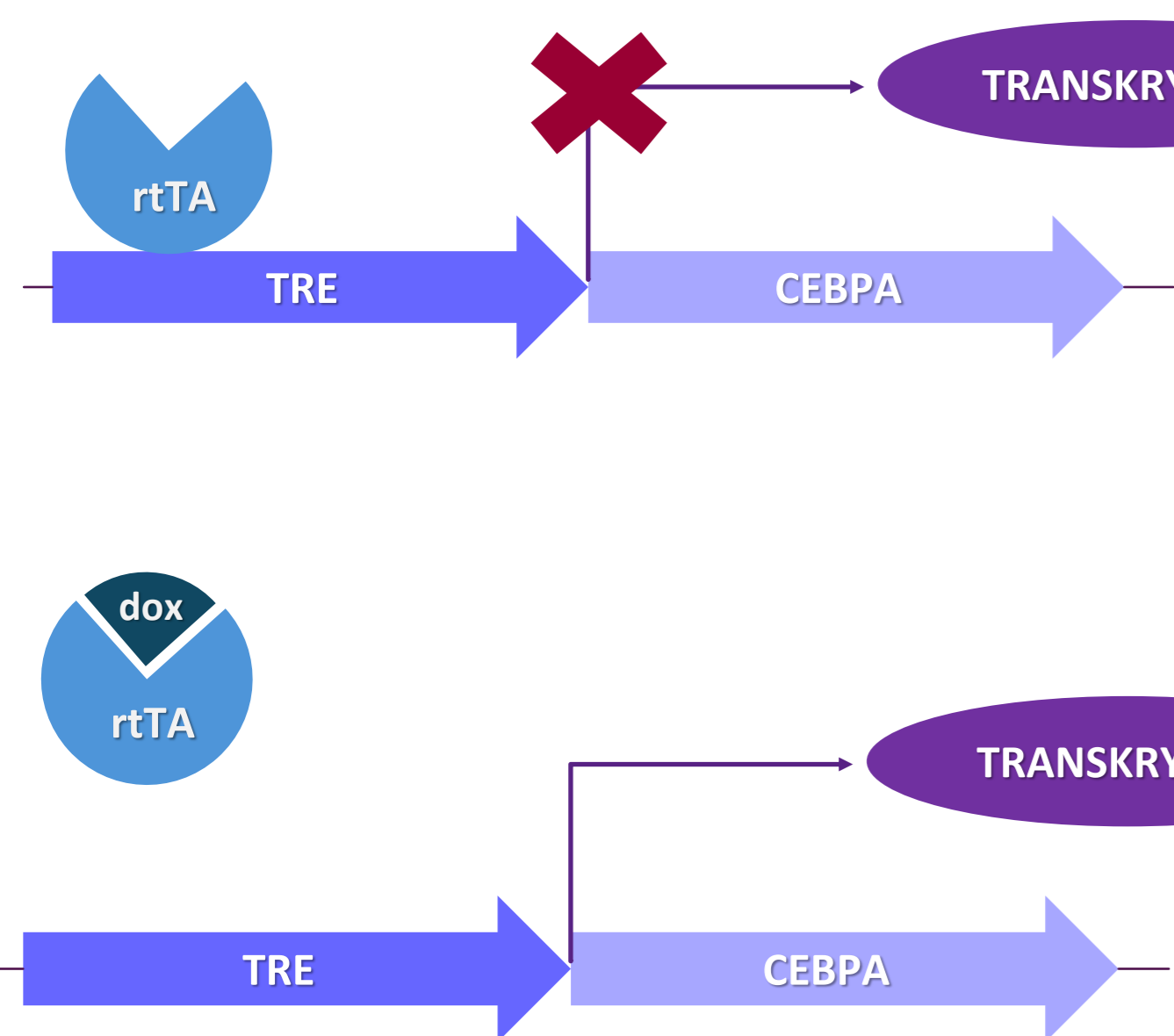
Białko CEBP α (ang. CCAAT enhancer binding protein α) jest jednym z czynników transkrypcyjnych, pod wpływem którego, komórki macierzyste różnicują w kierunku neutrofilii. Wzmacnia ekspresję białek ziarnistości neutrofilii, takich jak mieloperoksydaza, lizozym, kolagenaza, a także receptorów dla cytokin GM-CSF i G-CSF.

CEL

Stworzenie konstruktów zawierających sekwencję genu CEBPA oraz opracowanie modelu linii komórkowej K562, wykazującego indukowaną ekspresję genu dla białka CEBP α .

METODYKA

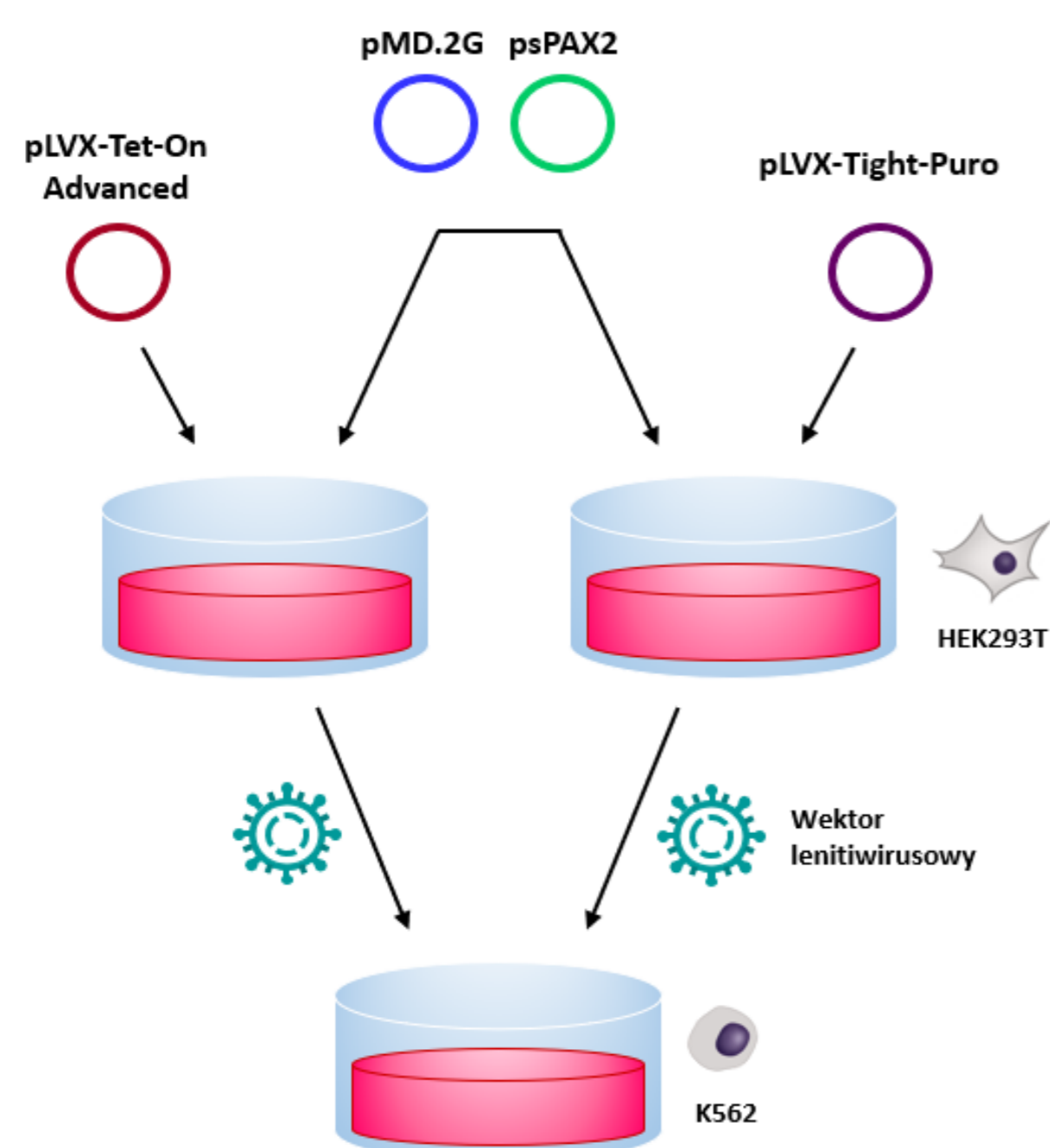
System lentiwirusowy Tet-On umożliwia indukację ekspresji białka za pomocą doksycykliny (dox).



W przypadku braku doksycykliny, odwrotny transaktywator kontrolowany tetracykliną (rtTA) blokuje transkrypcję genów.

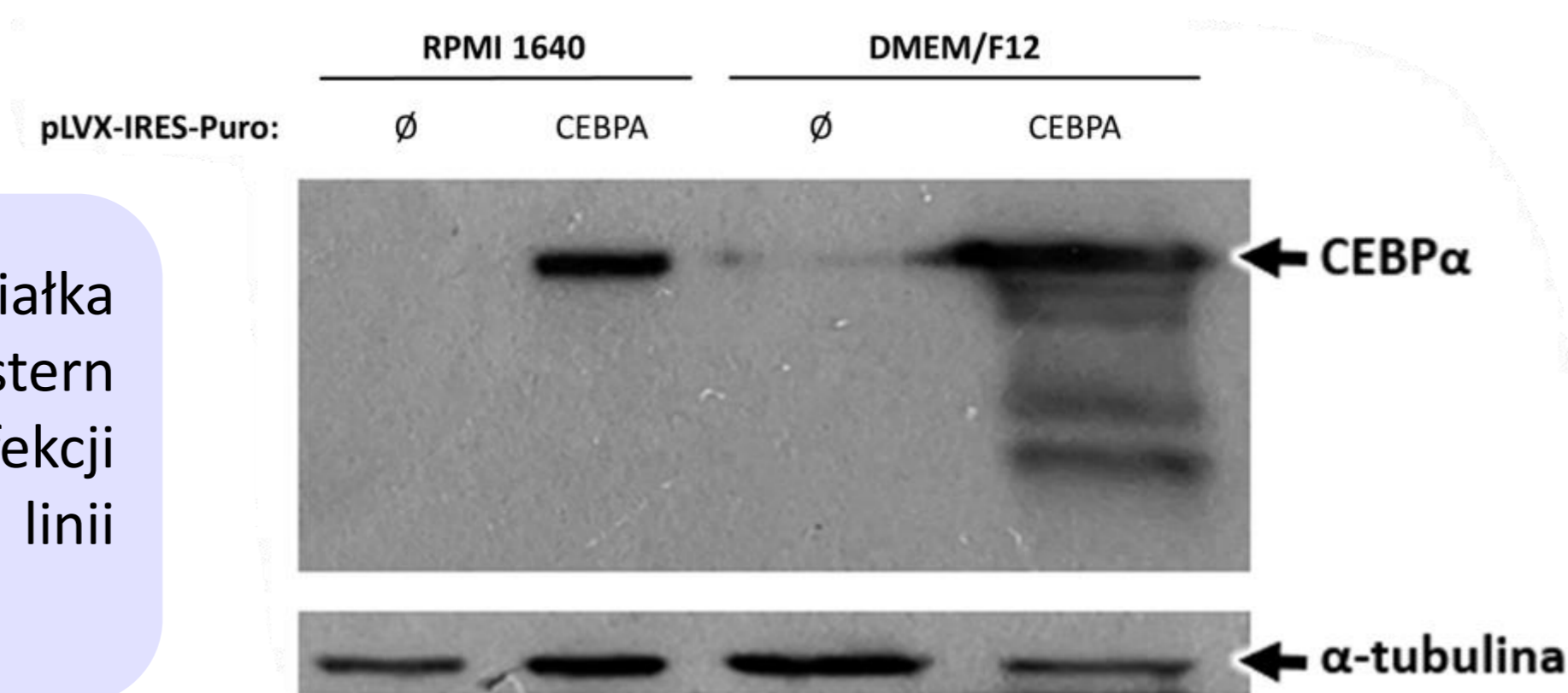
Gdy doksycyklina zostanie dodana, kompleks oddysocjuje umożliwiając transkrypcję.

Schemat transdukcji przeprowadzonej w celu uzyskania indukowanego systemu Tet-On w komórkach K562.

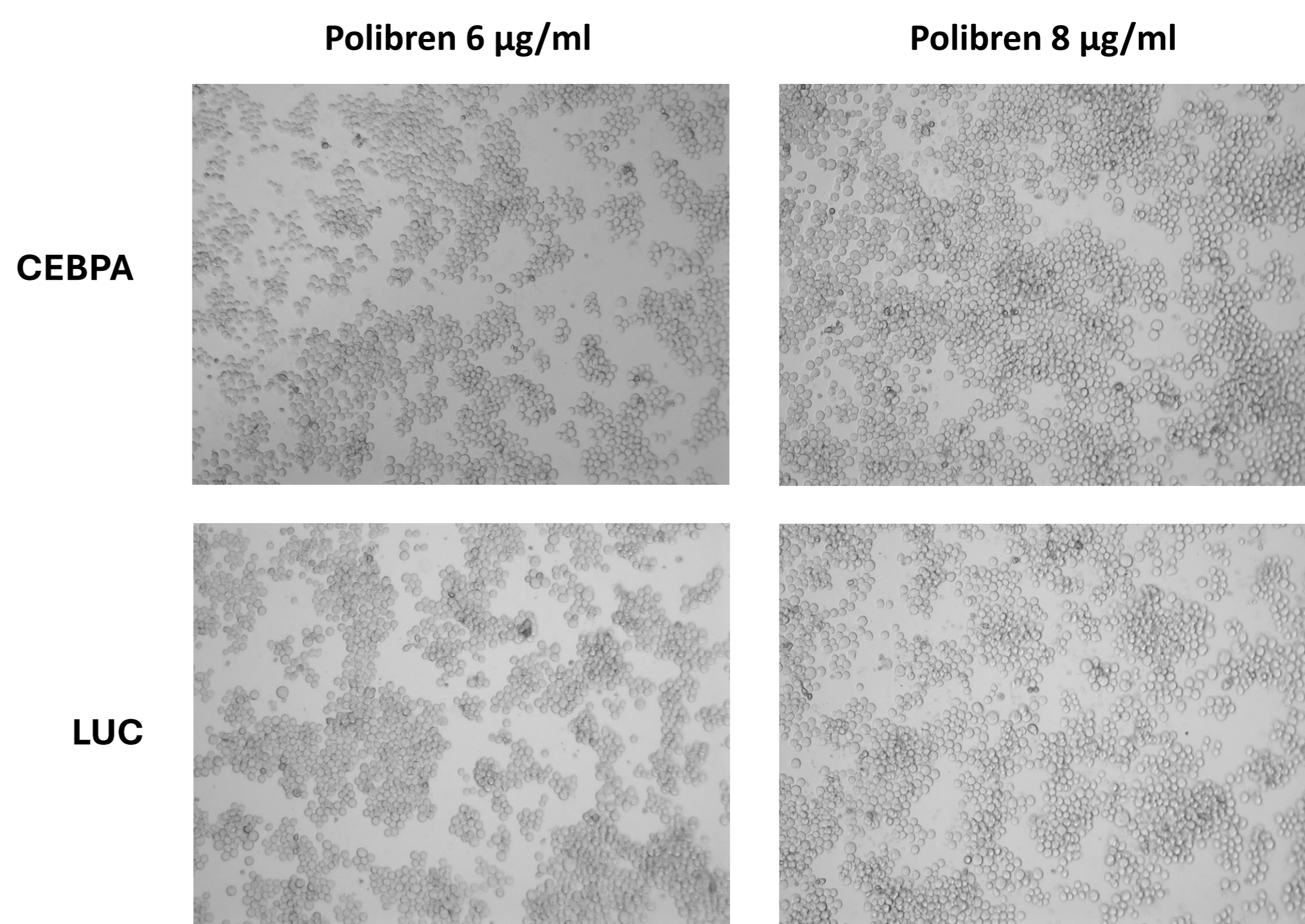


WYNIKI

Analiza ekspresji białka CEBP α metodą western blot po transfekcji przejściowej komórek linii HEK293T.

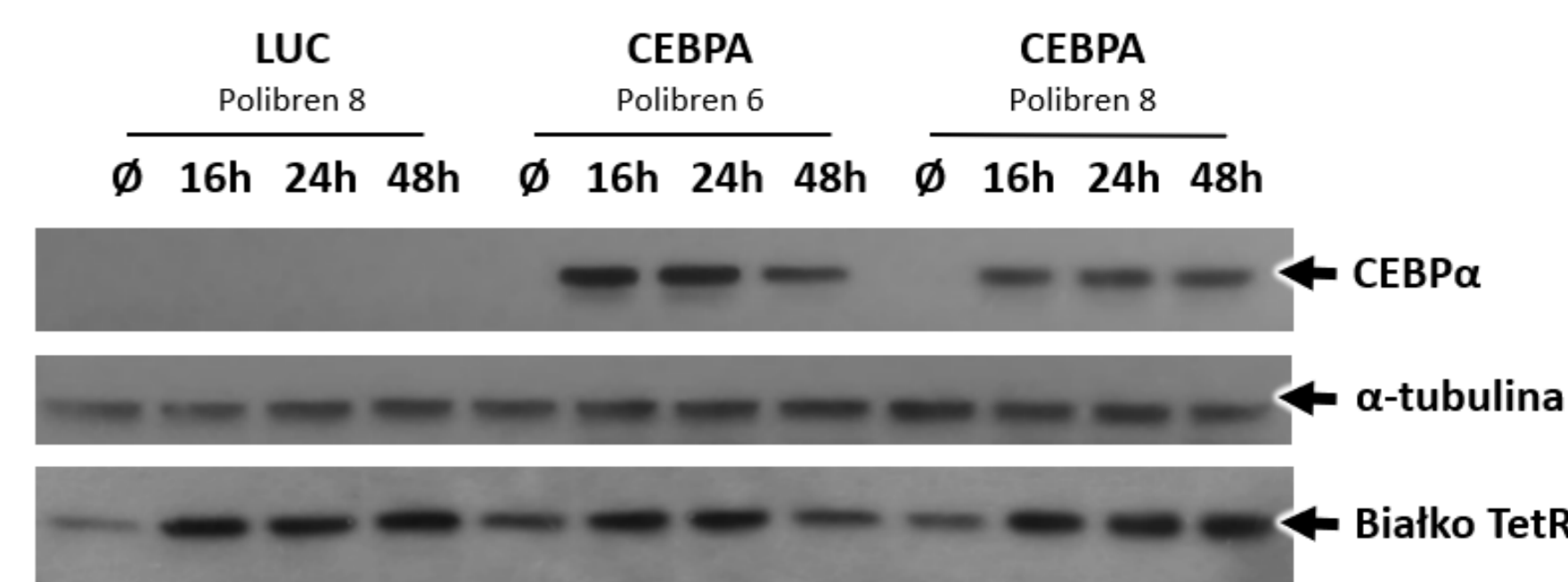
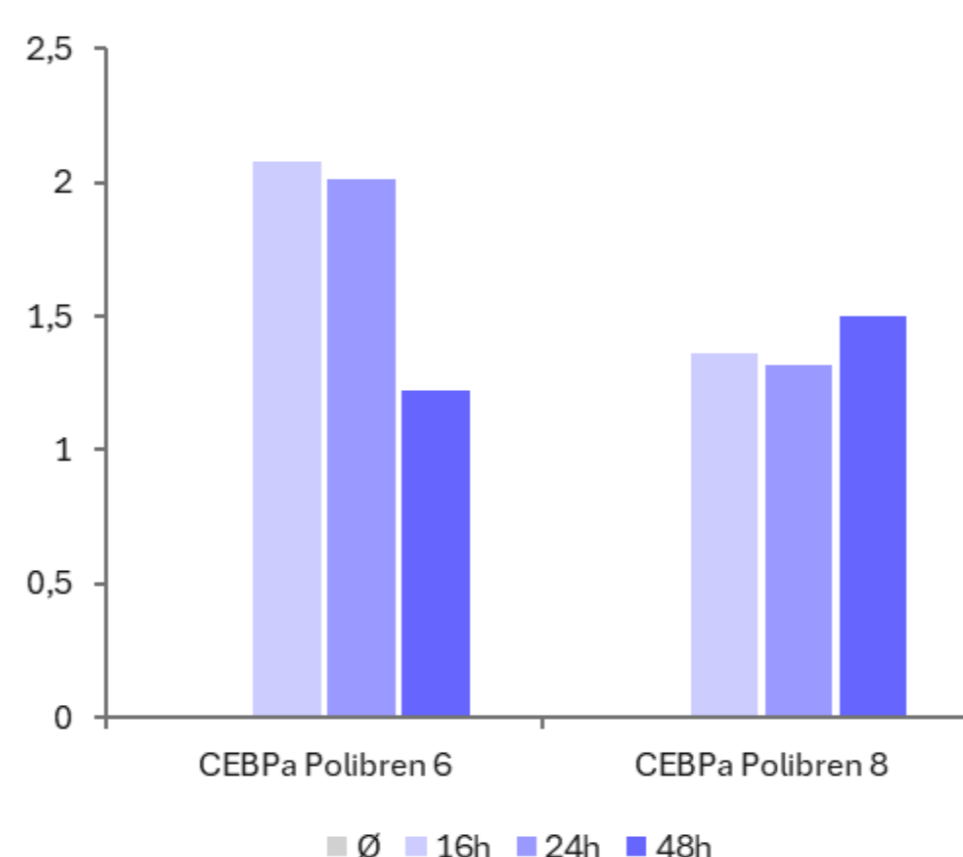


Zdjęcia obrazujące komórki K562 po transdukcji plazmidem pLVX-Tight-Puro-CEBPA i pLVX-Tight-Puro-LUC przy zastosowaniu dwóch różnych dawek polibrenu.



Wynik analizy ekspresji białka CEBP α i TetR metodą western blot po transdukcji komórek linii K562 plazmidami pLVX-Tight-Puro-CEBPA i pLVX-Tight-Puro-LUC oraz wykres przedstawiający stosunek ekspresji białka CEBP α do α -tubuliny.

Względna ekspresja białka CEBP α do α -tubuliny



WNIOSKI

Pomyślnie udało się zaprojektować i stworzyć poprawnie działający konstrukt zawierający sekwencję genu kodującego białko CEBP α , pozwalający na indukowanie ekspresji tego białka w określonym punkcie czasowym.

Kolejnym krokiem, który należałoby podjąć w przyszłości, powinna być szczegółowa ocena stopnia różnicowania zrekombinowanej linii komórkowej K562 po inkubacji z doksycykliną, w tym ocena ekspresji wybranych markerów powierzchniowych, charakterystycznych dla linii granulocytarnej.