

GIMNAZIJA NOVO MESTO

UTIŠANJE GENA *FUBP3* V HUMANIH CELICAH Z METODO CRISPR/CAS9

Raziskovalna naloga s področja molekularne biologije

Urban Malavašič

Marin Gazvoda de Reggi

MENTORICA: doc. dr. Nika Lovšin, univ. dipl. kem.

SOMENTORICA: mag. Branka Klemenčič, univ. dipl. inž. kem. inž.

Novo mesto, julij 2020

Zahvala

Raziskovalno delo sva opravila na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvaljujemo se mentorici in skrbnici doc. dr. Niki Lovšin, univ. dipl. kem., za mentorstvo in za vse strokovne in praktične nasvete ob nastajanju raziskovalnega dela. Lepo se zahvaljujemo tudi somentorici mag. Branki Klemenčič, univ. dipl. inž. kem. inž., za strokovno vodenje pri nastajanju raziskovalnega dela. Zahvala gre tudi Suzani Krvavici, profesorici slovenščine, za lektoriranje raziskovalne naloge in mag. Janezu Gorencu, profesorju angleščine, za lektoriranje povzetka v angleškem jeziku.

Izjava

Izjavljamo, da sva raziskovalno delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Nike Lovšin, univ. dipl. kem., in somentorstvom mag. Branke Klemenčič, univ. dipl. inž. kem. inž.



Urban Malavašič



Marin Gazvoda de Reggi

Povzetek

Metode molekulskega kloniranja oz. tehnologijo rekombinantne DNA uporabljamo za pripravo rekombinantnih molekul DNA ter za izražanje genskih produktov v gostiteljskih organizmih. Z metodami molekulskega kloniranja tako pripravimo gensko spremenjene organizme. Novejša metoda preurejanja genov je metoda CRISPR/Cas9, ki omogoča učinkovito in specifično urejanje genoma prokariontskih in evkariontskih celic, tudi človeških.

Sistem CRISPR/Cas izvira iz narave, kjer predstavlja specifičen imunski sistem prokariontov (arheje, bakterije), ki jim omogoča obrambo pred virusnimi in plazmidnimi tujki. CRISPR so palindromska, ponavljajoča se zaporedja na bakterijski DNA, med katerimi se nahajajo zaporedja, imenovana distančniki, kamor se vgradi del virusne DNA, s katero se okuži bakterija. Tako v bakterijski celici nastajajo transkripti virusne DNA. Ob naslednji okužbi z enakim patogenom se vežejo na virusno DNA in jo s pomočjo encimskega kompleksa Cas razgradijo ter tako uničijo. To celici omogoča spomin in učinkovito obrambo pred patogeni.

Ta sistem lahko v laboratoriju uporabimo za izbijanje (knockout) in tudi vstavljanje novih genov (knock-in). Za to se najpogosteje uporablja encim nukleaza Cas9, ki se veže na tarčno zaporedje in ga cepi. Pripravi se sintetična gRNA, ki vsebuje zapis, komplementaren tarčni DNA, in omogoči vezavo encima Cas9. Sintetično gRNA vnesemo v celico s pomočjo priprave plazmidnih konstrukтов. Po odkritju sistema se je njegova uporaba razširila na različnih področjih, tako v raziskavah kot tudi v zdravstvu in industriji.

FUBP3 je na novo odkriti gen, ki naj bi bil povezan z nastankom osteopo-

roze in predstavlja potencialno tarčo za diagnostiko in zdravljenje osteoporoze. V nalogi smo z metodo CRISPR/Cas9 pripravili rekombinanten plazmid za utišanje tega gena v humanih celicah. Pripravljeni plazmidni konstrukti bodo uporabljeni za pripravo matičnih celic z utišanim genom *FUBP3*, da bi odkrili njegov vpliv na nastanek kostnih bolezni pri ljudeh.

Ključne besede

CRISPR/Cas9, rekombinantna DNA, molekulska kloniranje, plazmid pX459, transfekcija, *FUBP3*.

Abstract

Molecular cloning methods (i.e. recombinant DNA technology) are used to produce recombinant DNA molecules and to express gene products in host organisms. Genetically modified organisms are thereby created. The CRISPR/Cas9 method is a more recent gene rearrangement technique, which enables efficient and specific gene editing of prokaryotic and eukaryotic cells, including human ones.

The CRISPR/Cas system originates from nature, where it represents a specific immune system of prokaryotes (archaea, bacteria) that allows them to defend against viral and plasmid pathogens. CRISPR is a region of bacterial DNA with palindromic, repetitive sequences, including sequences called spacers, where a portion of the viral DNA that infects the bacterium is inserted. Hence, viral DNA transcripts are generated in a bacterial cell. The second infection with the same pathogen is then deactivated by binding to the viral DNA and breaking it down with the help of the Cas enzyme complex and thus destroying it. This provides the cell with memory and an effective defence system against pathogens.

This system can be used in the laboratory for gene inactivation (knockout) and also for insertion (knock-in). The Cas9 nuclease enzyme, which binds to the target sequence and cleaves it, is most commonly used for this. A synthetic gRNA that contains a sequence complementary to the target DNA and allows for binding of the Cas9 enzyme is prepared. Synthetic gRNA molecules are introduced into the cell by the preparation of plasmid constructs. Since the discovery of the system, its applications have expanded in various fields, both in research, as well as in medicine and industry.

FUBP3 is a newly discovered gene that is thought to be associated with osteoporosis and is a potential target for its diagnosis and treatment. In this research, using the CRISPR/Cas9 method, a recombinant plasmid was prepared to silence this gene in human cells. The prepared plasmid constructs will be used to form stem cells with the silenced *FUBP3* gene to determine its effect on bone disease in humans.

Key words

CRISPR/Cas9, recombinant DNA, molecular cloning, pX459 plasmid, transfection, *FUBP3*.

Kazalo

1	Uvod	1
1.1	Arheje in bakterije	1
1.2	Virusi	2
1.2.1	Bakteriofagi	3
1.3	DNA	4
1.3.1	Kromosomska DNA	4
1.3.2	Plazmidi	5
1.4	Gensko inženirstvo	5
1.5	Sistem CRISPR/Cas v naravi	7
1.6	Sistem CRISPR/Cas v genskem inženiringu	10
1.6.1	Sistem CRISPR/Cas za izbijanje genov	12
1.6.2	Sistem CRISPR/Cas za tarčno vstavljanje genov	12
1.7	Aplikacije sistema CRISPR/Cas	13
1.7.1	CRISPR/Cas v zdravstvu	13
1.7.2	CRISPR/Cas v industriji	13
1.7.3	CRISPR/Cas v raziskavah	14

2 Namen	15
3 Cilji	15
4 Materiali	16
4.1 Kemikalije	16
4.2 Bakterijski sev	16
4.3 Celične linije	16
4.4 Fluorescentna barvila	16
4.5 Plazmidni vektorji	17
4.6 Reagenčni kompleti	17
5 Metode	18
5.1 Priprava bakterijske kulture z želenim plazmidom	18
5.2 Izolacija plazmidne DNA – Miniprep	18
5.3 Merjenje koncentracije plazmidne DNA – NanoDrop	19
5.4 Restrikcija plazmida	20
5.5 Čiščenje lineariziranega plazmida	21
5.6 Agarozna gelska elektroforeza	21

5.7	Kloniranje po Gibsonu	22
5.8	Bakterijska transformacija	23
5.9	Določanje nukleotidnega zaporedja rekombinantne vektorske molekule	23
5.10	Transfekcija v humano celično linijo	24
6	Rezultati	25
6.1	Molekularno kloniranje in delo z bakterijami	25
6.1.1	Plazmid pX459	25
6.1.2	Bakterijska transformacija	26
6.1.3	Izolacija plazmidne DNA	27
6.2	Kloniranje tarčne gRNA v plazmid pX459	28
6.2.1	Restrikcija plazmida	28
6.2.2	Agarozna gelska elektroforeza	29
6.2.3	Molekularno kloniranje po Gibsonu	30
6.3	Pomnoževanje rekombinantnega plazmida	30
6.3.1	Bakterijska transformacija	30
6.3.2	Izolacija plazmidne DNA	31

6.3.3	Sekvenčna analiza	31
6.4	Transfekcija plazmida v humane celice	32
7	Zaključek	34

1 Uvod

Živimo v času izjemnega znanstvenega in tehnološkega napredka. Z genskim inženiringom so znanstveniki že leta 1970 odkrili metode manipuliranja z molekulami DNA. Molekule DNA so z encimi rezali na manjše delce in jih združevali v nova zaporedja. Te delce so vnašali v različne organizme, kjer so se izrazili v obliki proteinskih produktov. Tako se je začelo obdobje sodobne biotehnologije, ki je omogočilo pripravo številnih rekombinantnih proteinov, uporabnih na področjih farmacevtske industrije, medicine, kmetijstva in prehrane. Leta 2001 sta mednarodni konzorcij Projekt človeški genom in podjetje Celera Genomics v priznanih revijah *Nature* in *Science* objavila nukleotidno zaporedje človeškega genoma. Človeški genom vsebuje 3 milijarde nukleotidnih parov. Določitev zaporedja baz je omogočila začetek obdobja funkcijske genomike, ki se ukvarja z razumevanjem celotnega genoma, da bi opisala biološko vlogo vseh 30.000 genov [1].

1.1 Arheje in bakterije

Prokariotske celice so bile prvi tip celic, ki se je razvil s pojavom življenja na Zemlji. Nimajo jedrne membrane, zato se genetski material (DNA) nahaja prosto v citoplazmi v obliki krožnega kromosoma. Pri nekaterih prokariotih so v citoplazmi prisotne tudi izvenkromosomske molekule DNA, ki jih imenujemo plazmidi. Prokariotske celice prav tako, za razliko od evkariontskih, nimajo mitohondrijev oz. ostalih membranskih organelov. Filogenetsko prokariote delimo v dve domeni, arheje in bakterije [2, 3].

Sprva odkrite arheje so bile ekstremofili, ki bivajo v okoljih s skrajnimi razmerami (termalni vreli, slana jezera), a je bilo kasneje ugotovljeno, da večino arhej najdemo v okolju z zmernimi razmerami. Arheje so bile v preteklosti klasificirane kot bakterije (*Archebacteria*), saj so jim po obliki in velikosti podobne, razlikujejo pa se v nekaterih presnovnih procesih, pri čemer so bolj podobne evkariontskim celicam. Evolucijska oddaljenost arhej in bakterij je bila ugotovljena v 80. letih 20. stol. s katalogiranjem genov, ki zapisujejo za ribosomalno rRNA 16S in se z evolucijo zelo malo spreminjajo [3, 4].

1.2 Virusi

Virusi so zelo majhni patogeni in predstavljajo najprimitivnejše oblike življenja. Virusna zgradba je zaradi majhnega genoma preprosta in ekonomična. Za razliko od drugih celic, ki so sposobne samostojne replikacije, ne vrši lastnega metabolizma. Posledica tega je obvezen parazitizem v drugih celicah med razmnoževanjem. Virusi se razmnožujejo v vseh vrstah organizmov, v živalih, rastlinah, protistih, bakterijah in arhejah [5].

Sestavljeni so iz genoma, ki ni v obliki kromosomov, niti nimajo jedra, zato je nukleinska kislina praviloma kar v sredini virusov in jo imenujemo sredica. Genom sestavlja ali DNA ali RNA in obsega od 1–2 do več 100 genov. Sredica je tesno povezana s proteinskim plaščem, kapsido [5].

Ko pride virus do celice, se mora nanjo pritrditi, za kar so potrebni primerni receptorji. Sledi vdiranje virusov, njihovih nukleokapsid ali le genoma v celico. V nekaterih primerih se spojita plazmalema in kapsida, virus pa vstopi z endocitozo. Virusi s svojim genomom vplivajo na celični metabolizem, da gostiteljska celica podvojuje virusno nukleinsko kislino

in sintetizira virusne proteine, ki lahko delujejo kot strukturni proteini ali pa sodelujejo pri virusni replikaciji kot encimi ali inhibitorji določenih celičnih procesov. Nato se virusi začnejo sestavljati in se v okolje sprostijo po razpadu celice ali z eksocitozo [5].

1.2.1 Bakteriofagi

Bakteriofagi so virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijskih celicah. Odkriti so bili pred 100 leti, od takrat pa omogočajo razvoj tako bazične kot tudi aplikativne biologije. Zaradi preprostosti zgradbe in delovanja so imeli ključno vlogo pri odkrivanju temeljev molekularne biologije (informacije – geni, zapisani v DNA, se preko RNA pretvarjajo v proteine), omogočili so odkritje tehnik (sekvenciranje genoma, genski inženiring) in reagentov (npr. restrikcijski encimi), ki so osnova moderne biologije [6].

Na začetku 20. stol. je bila narava gena najpomembnejše vprašanje v biologiji, ki se ga je skupina znanstvenikov lotila s preučevanjem bakteriofagov. Njihova morfologija je bila bolj ali manj neznana do pojava elektronskega mikroskopa v začetku 40. let 20. stol. Leta 1939 so bili pojasnjeni osnovni koncepti, kot so pritrditev na tarčno celico, latentna faza in sprostitvev novih virusov [6].

S pomočjo bakteriofagov so v tem času dokazali tudi, da je naravna selekcija posledica mutacij in ne obratno, kar je sovpadalo z Darwinovo teorijo evolucije, saj so bile pri namnoževanju bakterijskih kultur *E. coli* nekatere nastale kolonije odporne na bakteriofag T1, ostale pa ne. To danes razlagamo kot spontane spremembe v DNA, ki pa takrat še ni bila znana [6].

Tudi za dokaz, da gene sestavlja DNA, so bili bakteriofagi idealni model. Sestavljeni so namreč iz proteinske kapside in notranje DNA in znano je bilo, da ena izmed teh dveh snovi nosi dedni zapis, ni se pa vedelo, katera. V bakterijah, ki so jih okužili z bakteriofagi, ki so imeli z radioaktivnim izotopom ^{35}S označene proteine, z ^{32}P pa DNA, so opazili prisotnost ^{32}P , ^{35}S pa ne. Za to odkritje je bila leta 1969 podeljena Nobelova nagrada iz medicine [6].

1.3 DNA

DNA tvorijo nukleotidi, ki se v linearno polimerno verigo povezujejo preko fosfodiestrskih vezi. Te nastanejo, ko se dva nukleotida povežeta preko fosfata na 5. ogljikovem atomu prve sladkorne molekule in hidroksilne skupine na 3. ogljikovem atomu druge sladkorne molekule. Nukleotid, katerega 5' oz. 3' skupina ostane prosta, imenujemo 5' oz. 3' konec. Po dogovoru se 5' konec zapisuje na levi, 3' konec pa na desni. DNA najdemo v obliki dvojne vijačnice, molekule RNA pa v enoverižni obliki zaradi dodatnega kisikovega atoma na 2' mestu riboze, ki prepreči tvorjenje dvojne vijačnice [1].

1.3.1 Kromosomska DNA

Bakterijske celice nimajo jedra, zato se kromosomska DNA nahaja prosto v citoplazmi v obliki krožnega kromosoma. Kromosomska DNA v evkariontski celici ne nastopa v obliki prostih molekul, temveč je navita na bazične proteine (histone). Prokariontski kromosomi so podobno kot evkariontski dodatno zvit in, da lahko potečejo procesi prepisovanja,

podvojevanja in uravnavanja izražanja genov, morajo preiti v sproščeno obliko [1].

1.3.2 Plazmidi

Plazmidi so krožne izvenkromosomske molekule DNA, prisotne pri nekaterih prokariontih. Nahajajo se prosto v citoplazmi in se podvojujejo neodvisno od kromosomske DNA. To je možno zaradi nukleotidnega zaporedja (*ori*, angl. »origin of replication«), ki omogoča začetek replikacije. V zadnjih 60 letih je bilo izoliranih mnogo vrst plazmidov, ki so bili najdeni v nekaterih arhejah, bakterijah in prokariontih. Znanih je več kot 4600 genetskih sekvenc različnih plazmidov [1, 7].

Plazmidi so pomembno sredstvo za prenašanje genetskih informacij med prokarionti. Njihov namen je prenos genetskih značilnosti, ki so relevantne za prilagoditev na okolje ali odpornost proti patogenu. Tako omogočajo npr. sintezo antibiotikov, toksinov, odpornost proti antibiotikom in razgradnjo ksenobiotikov. To prokariontom omogoča hitro evolucijo in prilagoditev na okoljske razmere. Zaradi teh lastnosti plazmide uporabljamo tudi v genskem inženiringu. Plazmidi, ki se jih uporablja v laboratoriju, so spremenjeni tako, da omogočajo lažje vstavljanje fragmenta DNA, ki ga želimo pomnožiti, in imajo enega ali več genov z zapisom za odpornost proti antibiotiku ter vsaj eno mesto *ori* [1, 7].

1.4 Gensko inženirstvo

Postopek spreminjanja dednega materiala imenujemo tehnologija rekombinantne DNA ali gensko inženirstvo. Postopek vnosa gena je načrtovan

in natančen za razliko od dolgotrajnih postopkov križanja, kjer je spreminjanje genov in lastnosti naključno [8].

Prvi dosežki na področju genskega spreminjanja so se pričeli okoli leta 1920, ko so znanstveniki raziskovali učinke obsevanja z UV- in X-žarki na rastline. Ugotovili so, da obsevanje povzroči naključne mutacije v genomu, ki so nepredvidljive in v večini primerov tudi škodljive. V nekaterih primerih pa pride do mutacije na ravno pravem mestu v DNA, pri čemer organizem pridobi določeno zaželeno lastnost [1].

Razvoj metod molekularne biologije je omogočil bolj načrtno in usmerjeno spreminjanje genov. Nove tehnike so poleg večje natančnosti omogočile tudi vnos genov iz nesorodnih organizmov. Takim organizmov pravimo transgeni organizmi, saj vsebujejo gene drugih organizmov [8].

Zadnjih nekaj desetletij je zmožnost spreminjanja človeškega genoma spremenila pojem biologije in omogočila revolucijo na področju medicine. Prve poskuse tarčnega vnosa tuje DNA v celice so izvedli že leta 1964. Dokazali so, da se lahko z uporabo virusov spremeni genom evkariontskih celic. Virusi so zaradi svojega načina razmnoževanja odličen vektor za vnos genov v celični genom. Virus ob okužbi svojo nukleinsko kislino in s tem željeni gen vgradi v genom gostitelja [1].

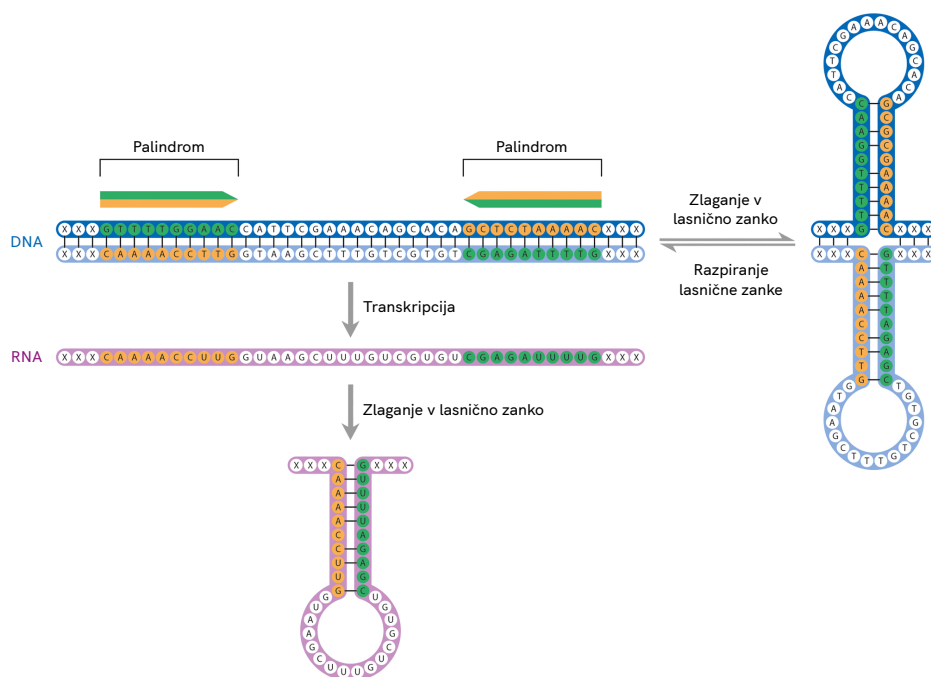
Preurejanje genoma omogoča izključevanje neželenih genov, spreminjanje izražanja in pa tudi vnos rekombinantne DNA v natančno določene odseke v genomu. Za vgradnjo DNA v genom so potrebni specifični encimi, ki so zmožni razreza dvojne vijačnice in vstavitve odseka DNA molekule v genom. Ti encimi omogočijo nastanek zlomov na obeh verigah dvojne vijačnice. Za genski inženiring se uporabljajo restrikcijski encimi, ki omogočajo specifično rezanje dvojne vijačnice

DNA. Uporabljajo se nukleaze cinkovih prstov (ZFN; angl. »zinc-finger nucleases«), efektorske nukleaze podobne transkripcijskim aktivatorjem (TALEN; angl. »transcription activator-like effector nuclease«) in nazadnje odkriti CRISPR/Cas sistem. Kratica CRISPR v angleščini pomeni »clustered regularly interspaced short palindromic repeats«. Prva dva sistema se redkeje uporabljata zaradi kompleksnosti in omejenosti uporabe. ZFN so proteini, ki se vežejo na določen del DNA in delujejo kot restrikcijski encimi. Omejitev metode je v tem, da je potrebno za vsak eksperiment ustvariti novo zaporedje ZFN, kar je drag in zamuden postopek. TALEN pa so veliki proteini in že njihov vnos v celično jedro je zahteven proces. Pri sistemu CRISPR/Cas pa je priprava konstruktov enostavna. Edino, kar moramo narediti, je, da sintetiziramo vodilno RNA. Ta metoda se je izkazala kot učinkovita in specifična za urejanje genoma prokariontskih in evkariontskih celic, tudi človeških [9, 8].

1.5 Sistem CRISPR/Cas v naravi

Tudi arheje in bakterije lahko zbolijo, če se okužijo z virusi. Prav tako kot evkarionti morajo tudi prokarionti imeti način, da se obranijo pred virusnimi in plazmidnimi tujki. Ta specifičen imunski sistem se imenuje CRISPR/Cas. Arheje (80 %) in bakterije (45 %) imajo v svojem genomu ali na plazmidih zaporedja, imenovana CRISPR [10].

Gre za kratke palindromske ponovitve določenih zaporedij znotraj genoma bakterije (slika 1). Nukleotidi se vedno povezujejo na enak način, adenin s timinom v DNA oz. z uracilom v RNA in citozin z gvaninom. Veriga nukleotidnega zaporedja je palindromska, če je enaka zaporedju komplementarne verige (vsaka se bere iz smeri 5' → 3') [10].

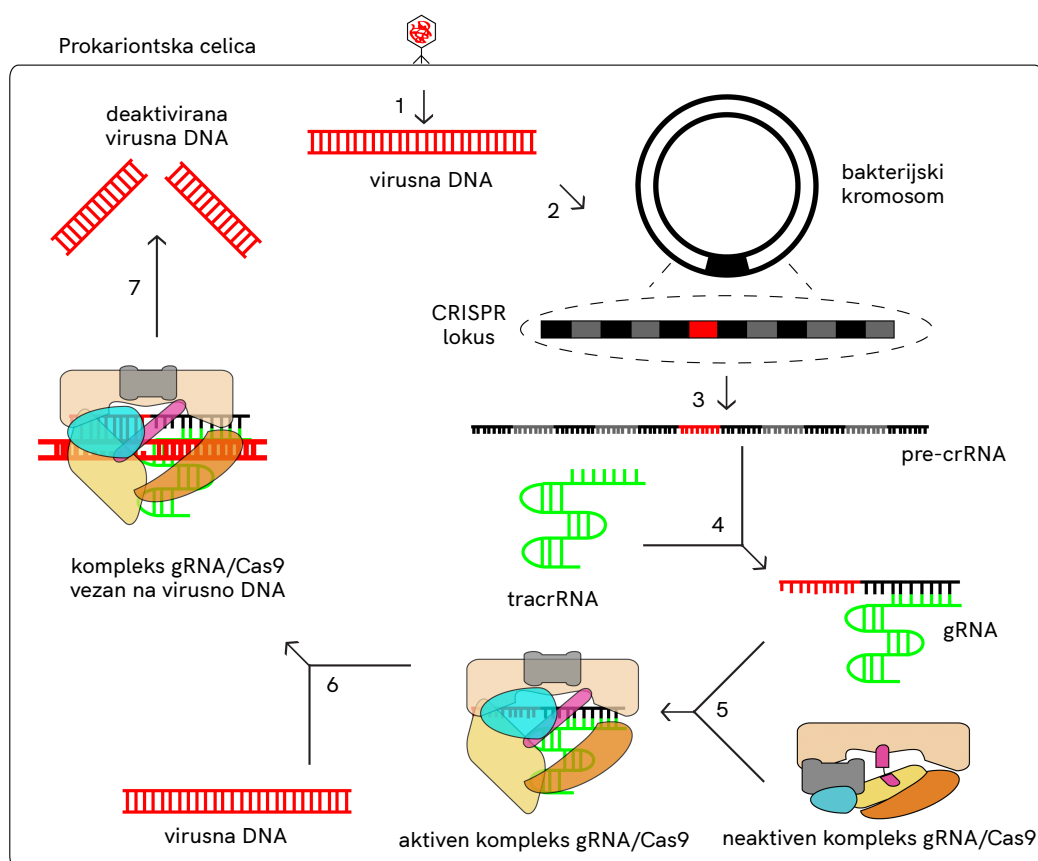


Slika 1: Palindromsko zaporedje je zaporedje baz v DNA, ki se bere v smeri 5' → 3' enako na obeh verigah, in tako lahko s komplementarnim parjenjem baz nastane struktura zanke [11].

Bakterije imajo v genomu še gene *cas* (angl. »CRISPR-associated genes«), ki zapisujejo za restriksijski encim. Ta deluje kot molekularne škarje, ki prerežejo dvojno vijačnico DNA. Skupaj tvorijo sistem CRISPR/Cas, ki med drugim omogoča bakterijam zaščito pred virusi [10].

CRISPR so palindromska, ponavljajoča se zaporedja 29 nukleotidov, med katerimi se nahajajo 32 nukleotidov dolga zaporedja, imenovana distančniki, kamor se vgradi del virusne DNA, ki jo izrežejo encimi Cas. Tako v bakterijski celici nastajajo transkripti virusne DNA, imenovani CRISPR RNA (crRNA), ki se vežejo na virusno DNA, ki bi ponovno rada okužila bakterijsko celico, in ga s pomočjo encimskega kompleksa Cas

razgradijo ter tako uničijo. Bakterijski obrambni sistem je dosežen takrat, ko se v celici prepiše iz CRISPR segmenta crRNA in tracrRNA (angl. »transactivating RNA«) v gRNA (angl. »guide RNA«). Kompleks gRNA-Cas lahko tako razgradi virusno DNA. Tak sistem omogoča celici spomin in učinkovito obrambo pred škodljivimi virusi (slika 2) [10].



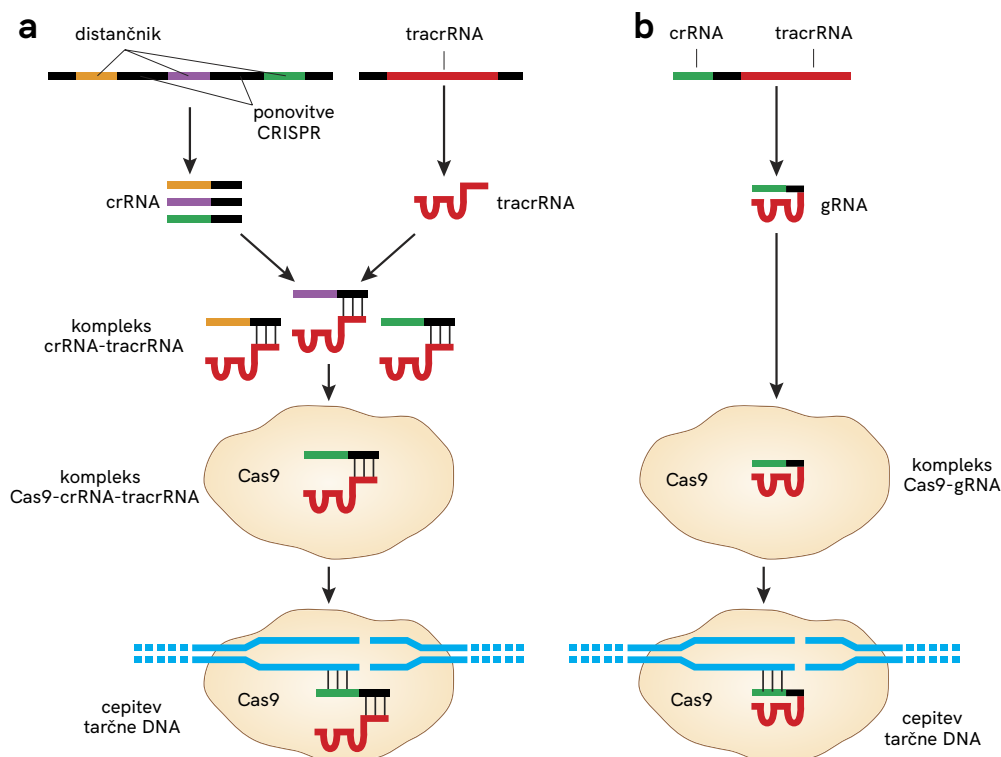
Slika 2: CRISPR deluje kot obrambni sistem arhej in bakterij. Del virusne DNA se vključi v distančnik zaporedja CRISPR in se prevede v pre-crRNA. Za tvorbo aktivnega kompleksa CRISPR/Cas9 je potrebna molekula tracrRNA, ki skupaj s pre-crRNA tvori gRNA. Ob naslednjem vdoru virusne DNA aktivni kompleks to razgradi [12].

1.6 Sistem CRISPR/Cas v genskem inženiringu

CRISPR je od RNA odvisen sistem, ki se ga izkorišča v genskem inženirstvu in je uporaben tako v bazičnih raziskavah kot tudi v biotehnoloških aplikacijah. Prvotno je bila metoda razvita za izbijanje genov (knockout), toda z optimizacijo se lahko uporablja tudi za vstavljanje novih genov (knock-in) v celice. Odvisno od celičnih popravljalnih mehanizmov se lahko z metodo CRISPR/Cas vstavlja ali pa odstranjuje tarčne gene [9].

Za laboratorijsko spreminjanje humanih celic se najpogosteje uporablja encim nukleaza Cas9. Cas9 izhaja iz bakterije *Streptococcus pyogenes*. Transgena celica mora izražati Cas9 in gRNA. V laboratoriju se najprej pripravi vodilna RNA (gRNA), ki je sestavljena iz crRNA, katere zaporedje baz je enako zaporedju gena, ki ga želimo spremeniti, in tracrRNA, katere zaporedje baz je enako delu zaporedja CRISPR in omogoča prepoznavo in vezavo encima Cas na tarčno DNA (slika 3). Za delovanje encima Cas je potrebno kratko zaporedje PAM (angl. »protospacer adjacent motif«), ki je prisotno samo v virusni DNA oz. na plazmidu in ni prisotno v bakterijskem genomu. Ko ga encim Cas prepozna, lahko razreže tarčno DNA. PAM zaporedje tako omogoča bakterijam, da ločijo med tujo in lastno DNA [13].

Cas9 prepozna PAM motiv 5' - NGG - 3' (N je katerikoli nukleotid, ki mu sledita dva gvanina), ki mora biti nujno prisoten, da se lahko veže na tarčno zaporedje in ga cepi. Distančnik v CRISPR lokusu ne vsebuje motiva PAM, zato encim ne more cepiti tega zaporedja. Ko pa se del virusne ali plazmidne DNA z zaporedjem PAM vgradi v CRISPR distančnik, to zaporedje prepozna encim Cas9 in ga cepi. Obstaja več različnih Cas encimov iz različnih bakterij, ki prepoznavajo različne PAM motive [13].



Slika 3: CRISPR/Cas sistem v naravi in uporaba v genskem inženiringu
 (a) V naravi se virusna DNA vgradi v distančnik CRISPR regije. Ob prepisu nastane crRNA, ki se poveže z tracrRNA in omogoča nastanek aktivnega kompleksa Cas9-crRNA-tracrRNA, ki povzroči dvojni lom v tuji DNA.
 (b) V laboratoriju se pripravi sintetična gRNA, ki vsebuje zapis komplementaren tarčni DNA (crRNA) in tracrRNA, da omogoči vezavo encima Cas9. Aktiven kompleks Cas9-crRNA-tracrRNA povzroči dvojni lom v tarčni DNA [13].

1.6.1 Sistem CRISPR/Cas za izbijanje genov

V laboratoriju se sintetizira sintetična gRNA na tak način, da vsebuje zapis za crRNA, tracrRNA in na 3' koncu še PAM motiv. CrRNA je sintetizirana iz približno 20 nukleotidov. Takšno zaporedje mora biti prisotno v genomu celice le na mestu, ki ga želimo modificirati. V celici nastane gRNA in encim Cas9, ki se veže preko motiva PAM na gRNA. Tako nastane ribonukleoproteinski kompleks. Ta vezava povzroči konformacijsko spremembo v encimu Cas in tako preide iz neaktivne v katalitično aktivno obliko, ki je sposobna cepiti dvoveržno DNA. gRNA prepozna komplementarno zaporedje (zaporedje, ki bi ga radi modificirali) v genomu in se veže nanj. Cas9-gRNA kompleks omogoči nastanek dvojnega zloma v verigi DNA. Celica vključi popravilne mehanizme in poskuša popraviti prekinjeno verigo DNA. Najpogosteje pri popravljanju naredi napake in pride do vstavitve napačnih nukleotidov, ki vodijo v neaktivno obliko proteina. V nekaterih celicah pride do t. i. knockوتا, kar pa se mora še dodatno preveriti z laboratorijskimi testi [9, 13].

1.6.2 Sistem CRISPR/Cas za tarčno vstavljanje genov

Ta sistem mora poleg sintetične gRNA in Cas vsebovati še zaporedje, ki omogoča tarčno popravljanje dvojnih zlomov v DNA. Ta zaporedja se dodajo na dveh mestih – pred začetkom in koncu sekvence crRNA. Verjetnost, da uspe celici popravilo DNA po tem mehanizmu, je manjša od 10 %. Da bi izboljšali učinkovitost metode, se uporablja modificiran encim Cas9, ki omogoča razrez samo ene verige dvojne vijačnice, in encim reverzna transkriptaza, ki iz gRNA omogoča nastanek enojne verige DNA

ter se lahko nato vgradi v mesto v genomu. Celični DNA popravljalni mehanizmi popravijo še drugo stran verige, da je ujemanje med bazami komplementarno [14].

1.7 Aplikacije sistema CRISPR/Cas

Po odkritju sistema CRISPR/Cas se je njegova uporaba razširila na različnih področjih, tako v raziskavah kot tudi v zdravstvu in industriji. Danes lahko znanstveniki popravijo ali zamenjajo gene kateregakoli organizma, hkrati pa je ta tehnologija enostavna in cenovno dostopna [9].

1.7.1 CRISPR/Cas v zdravstvu

Metoda CRISPR/Cas omogoča enostavno pripravo celičnih kultur, rastlinskih in živalskih modelov za študij različnih bolezenskih stanj in je perspektivna tehnika za direktno zdravljenje številnih genetskih bolezni, kot je npr. cistična fibroza. Zamenjava okvarjenega gena z zdravim je cilj genetskega zdravljenja, ki ga ta tehnologija omogoča. Tehnologija je obetavna tudi za zdravljenje rakavih obolenj. Znanstveniki poskušajo s sistemom CRISPR/Cas utišati gene, ki povzročajo nekontrolirano celično razmnoževanje, in aktivirati gene, ki zavirajo delitve rakavih celic [15].

1.7.2 CRISPR/Cas v industriji

Veliko zanimanje za to tehnologijo je v živilski industriji. Bakterije *Streptococcus thermophilus*, ki se jih uporablja v mlečni industriji predvsem za proizvodnjo jogurtov, so zelo občutljive na okužbe z virusi. Okužbe

povzročajo spremenjene senzorične lastnosti in tako poslabšajo kakovost mlečnih izdelkov. V mlekarskih industrijah že pripravljajo seve, ki bi bili odporni na škodljive viruse. Uporaba takšnih bakterij bi izboljšala kakovost in obstojnost mlečnih izdelkov. Raziskovalci s sistemom CRISPR/Cas že pripravljajo pšenico brez glutena, ki bi jo lahko uživali tudi bolniki s celiakijo, gobe, ki pri rezanju ne potemnijo, in oljne rastline, ki vsebujejo povečan delež zdravih maščobnih kislin [16].

1.7.3 CRISPR/Cas v raziskavah

V laboratoriju je s to tehnologijo enostavno spreminjati različne živalske, rastlinske in tudi humane celice. Je izredno uporabno genetsko orodje, saj omogoča rezanje izbranih delov v DNA in s tem raziskovanje vpliva točno določenega gena na izbrano lastnost. Ustvarjanje gensko spremenjenih celičnih modelov, ki bi zadosti natančno povzemale človeško patologijo, je bilo namreč zelo težavno. Z odkritjem sistema CRISPR/Cas pa lahko naredimo transgene živalske modele, ki predstavljajo odličen model za človeške bolezni in s tem boljše pogoje za preučevanje in razvoj novih zdravil [9].

2 Namen

Namen raziskovalne naloge je z metodo molekulskega kloniranja CRISPR/Cas9 pripraviti plazmidni konstrukt za utišanje gena *FUBP3* (angl. »far upstream element binding protein 3«) v humanih celicah 293T. Utišanje bomo izvedli z ustrezno gRNA, ki jo bomo vstavili v Cas9 plazmid. Tako pripravljene plazmidne konstrukte bomo s postopkom transfekcije vnesli v humano celično linijo.

Predvidevamo, da lahko z metodo CRISPR/Cas9 uspešno utišamo gen *FUBP3* v humani celični liniji. V nalogi želimo preveriti naslednjo hipotezo: metoda molekulskega kloniranja CRISPR/Cas9 omogoča pripravo rekombinantnega plazmida za utišanje tarčnega gena *FUBP3*.

3 Cilji

Cilji raziskovalne naloge so:

1. Preveriti, ali metoda molekulskega kloniranja CRISPR/Cas9 omogoča pripravo rekombinantnega plazmida za utišanje tarčnega gena *FUBP3*.
2. Osvojiti tehniko molekulskega kloniranja z metodo CRISPR/Cas9.
3. Osvojiti postopek aseptičnega dela z bakterijskimi in humanimi celičnimi linijami.
4. Osvojiti postopek transfekcije.

4 Materiali

4.1 Kemikalije

- agar (Fluka)
- agarozna (Sigma-Aldrich)
- antibiotik ampicilin (Sigma-Aldrich)
- Luria-Bertani broth (Sigma-Aldrich)
- medij DMEM za gojenje celičnih kultur (Gibco)
- pufer CutSmart[®] 10x (NEB)
- pufer TAE (Thermo Fisher Scientific)
- encim BbsI (NEB)

4.2 Bakterijski sev

- One Shot[™] TOP10 kompetentne celice *E. coli* (Invitrogen)

4.3 Celične linije

- sesalska celična linija 293T (ATCC)

4.4 Fluorescentna barvila

- Blue/Orange Loading Dye (Promega)

- Midori Green (Nippon Genetics)

4.5 Plazmidni vektorji

- pX459 (Addgene)

4.6 Reagenčni kompleti

- NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB)
- QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- PolyJet[™] In Vitro DNA Transfection Reagent (SignaGen)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)

5 Metode

5.1 Priprava bakterijske kulture z želenim plazmidom

Da bi namnožili izbrani plazmid pX459, smo izvedli postopek transformacije, to je vnos pDNA v kompetentne bakterijske celice. Odmrznili smo 50 μL kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* in jim dodali 1 μL plazmidne DNA. Celice smo najprej inkubirali 30 minut na ledu in nato 45 sekund v vodni kopeli pri 42 °C, da so sprejele plazmidno DNA. Celice smo vrnili na led za 2 minuti in jim nato dodali 500 μL tekočega gojišča Luria Bertani (LB), ki ni vsebovalo antibiotikov. Suspenzijo smo inkubirali 1 uro pri 37 °C ob nežnem stresanju (177 RPM).

Celice smo nacepili v petrijevko s trdnim gojiščem LBA, ki vsebuje tudi antibiotik ampicilin, da se celice brez plazmida niso razmnoževale (plazmid pX459 nosi zapis za rezistenco bakterij na ampicilin). Gojišče smo čez noč inkubirali na 37 °C, da so se bakterije namnožile.

Naslednji dan smo dobro ločeno bakterijsko kolonijo prenesli v 5 μL tekočega gojišča LBA, z dodanim ampicilinom, in kulturo bakterij inkubirali čez noč na 37 °C pri nežnem stresanju (177 RPM).

5.2 Izolacija plazmidne DNA – Miniprep

Plazmidno DNA smo iz prekonočne kulture izolirali po protokolu QIAprep Miniprep s pomočjo komercialno dostopnega reagenčnega kompleta QIAprep® Spin Miniprep Kit, ki omogoča izolacijo do 2 μg plazmidne DNA. Izolacija temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, ki ji sledi adsorpcija DNA na silikagel membrano v prisotnosti visoke koncentracije soli.

Prekonočno kulturo smo prenesli v 2 μ L sterilno mikrocentrifugirko in centrifugirali na 8000 RPM 5 minut. Supernatant smo odstranili in usedlino zbranih bakterijskih celic resuspendirali v 250 μ L pufra P1 z dodatkom RNase raztopine. Nato smo celicam dodali še 250 μ L alkalnega lizirnega pufra P2. Ta vsebuje ionski detergent NaDS, ki povzroči razpad bakterijskih membran in s tem sprostitvev celične vsebine, in NaOH, ki povzroči denaturacijo kromosomske in plazmidne DNA ter proteinov. Po 3-minutni lizi celic smo reakcijo ustavili s 350 μ L nevtralizacijskega pufra N3, vsebino takoj premešali in centrifugirali na 13 000 RPM 10 minut. Supernatant smo nanesti na QIAprep kolono in 60 sekund centrifugirali na 13 000 RPM. Po odlitju eluata smo QIAprep kolono najprej sprali s 500 μ L pufra PB in ponovno centrifugirali na 13 000 RPM 60 sekund in odlili eluat. QIAprep kolono smo nato sprali še z 750 μ L pufra PE in dvakrat centrifugirali na 13 000 RPM 60 sekund. Po spiranju smo QIAprep kolono prenesli v novo, sterilno 1,5 mL mikrocentrifugirko, odpipetirali 50 μ L dH₂O in ponovno centrifugirali 1 minuto na 13 000 RPM. Tako dobljeni vodni raztopini plazmidne DNA smo nato izmerili koncentracijo.

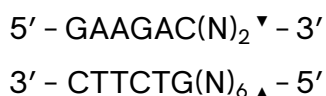
5.3 Merjenje koncentracije plazmidne DNA – NanoDrop

Po izolaciji smo plazmidno DNA kvantificirali (koncentracija, čistoča) z merjenjem absorbance pri 260 nm s spektrofotometrom NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Rockford, ZDA). NanoDrop omogoča merjenje koncentracij nukleinskih kislin v mikro volumnih. Na podlagi absorbance pri 260 nm spektrofotometer izračuna koncentracijo DNA v raztopini, iz razmerja absorbanca A₂₆₀/A₂₈₀ pa oceni čistost raztopine DNA. Merilni instrument smo umerili z 1,5 μ L dH₂O in nato nanj nanesti 1,5 μ L vzorca.

5.4 Restrikcija plazmida

Za restrikcijo plazmidov uporabljamo restrikcijske endonukleaze – restriktaze, ki na točno določenih mestih cepijo molekulo DNA. Restriktaze so encimi, ki prepoznajo 4–8 baznih parov dolga zaporedja v dvovertični DNA in katalizirajo hidrolizo obeh verig. Koliko encima potrebujemo, je odvisno od njegove aktivnosti, števila prepoznavnih mest na DNA, temperature in časa rezanja.

Za razrez plazmida pX459 smo v 1,5 mL mikrocentrifugirki pripravili reakcijsko mešanico, ki jo prikazuje tabela 1. Uporabili smo restrikcijski encim BbsI, ki s cepitvijo plazmida omogoči njegovo linearizacijo. Prepozna in reže nukleotidno zaporedje na mestu, označenem s puščicama:



Najzanesljivejše je z encimom rezati plazmid v pogojih, ki so zanj najoptimalnejši, kar pomeni, da smo v reakcijsko mešanico dodali najprimernejši pufer (CutSmart).

Tabela 1: Reakcijska mešanica za restrikcijo plazmida pX459.

pDNA (pX459, koncentracija = 293,5 ng/μL)	5 μL
destilirana voda	3 μL
pufer CutSmart 10x (NEB)	1 μL
BbsI	1 μL

Vsebino smo v epico pipetirali na ledu, da smo encim zaščitili pred delovanjem proteinaz, ki bi onemogočile njegovo delovanje. Restriksijsko reakcijo smo 2 uri inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C in nato še 20 minut pri 65 °C, da smo encim toplotno deaktivirali.

5.5 Čiščenje lineariziranega plazmida

Da smo linearni plazmid očistili, smo sledili postopku QIAquick PCR Purification Kit. Celoten volumen smo prenesli na QIAquick kolono s silikagel membrano in centrifugirali na 13 000 RPM 1 minuto. Dobljeni filtrat smo zavrgli in kolono sprali s 750 μ L pufra PE in centrifugirali na 13 000 RPM 1 minuto. Postopek centrifugiranja smo po odlitju filtrata ponovili. Po prenosu kolone v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko, smo DNA iz kolone eluirali z dodatkom 30 μ L dH₂O na 13 000 RPM 1 min. Koncentracijo lineariziranega plazmida smo določili spektrofotometrično na NanoDropu.

5.6 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozo (1,5 g) smo zatehtali v čašo ter dolili 150 mL pufra TAE 1x, ki smo ga pripravili tako, da smo v merilnem valju 20 mL pufra TAE 50x dopolnili z dH₂O do oznake 1 L, in barvilo Midori Green Advance DNA Stain. Gel smo prevreli v mikrovalovni pečici ob večkratnem mešanju, da so se razpustili vsi delčki agaroze. V model z vstavljenim glavničkom smo nalili gel. V žepke smo nanесли standard molekulskih mas, nerazrezan plazmid, razrezan plazmid in razrezan očiščen plazmid (tabela 2). Vzorcem smo dodali še barvilo Blue/Orange loading dye. Elektroforeza je potekala pri 110 V.

Tabela 2: Pripravljene vzorci za agarozno gelsko elektroforezo.

standard molekulskih mas	nerazrezan plazmid	razrezan plazmid	razrezan očiščen plazmid
5 μ L	2 μ L pDNA + 3 μ L barvila	2 μ L pDNA + 3 μ L barvila	2 μ L pDNA + 3 μ L barvila

5.7 Kloniranje po Gibsonu

Nukleotidno razmerje, ki smo ga izbrali za gRNA, je bilo:

5' - TATACTGAGGGGTCCACTAG - 3'

Pri kloniranju po Gibsonu je treba insert, ki ga želimo vstaviti v lineariziran plazmid, podaljšati s po približno 25 baznih parov dolgima zaporedjema na vsaki strani inserta, ki se ujemata s sekvencama na plazmidu ob restrikcijskem mestu. Celotno zaporedje inserta s prilegajočimi se regijami je bilo:

**5' - ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
TATACTGAGGGGTCCACTAG
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT - 3'**

Insert gRNA smo prejeli v liofilizirani obliki, zato smo ga najprej resuspendirali v dH₂O in razredčili na koncentracijo 1 μM. Mešanico inserta, lineariziranega plazmida in Gibson Master Mix (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix) smo inkubirali 160 min na 50 °C (tabela 3). Gibson Master Mix vsebuje encime eksonukleazo, polimerazo in ligazo.

Tabela 3: Reakcijska mešanica za kloniranje.

(a) Vsebina vzorca (v epici 1).

Insert (koncentracija = 1 μM)	5 μL
pDNA (koncentracija = 27,2 ng/μL)	5 μL
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 2x	10 μL

(b) Vsebina kontrole (v epici 2).

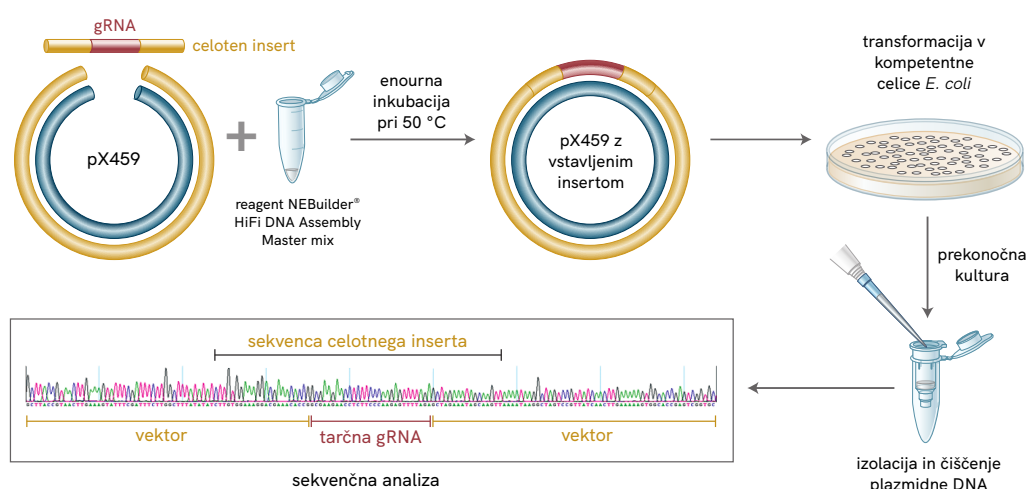
pozitivna kontrola	5 μL
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 2x	5 μL

5.8 Bakterijska transformacija

5 μ L rekombinantnih vektorskih molekul, ki smo jih dobili po Gibsonovem kloniranju, smo dodali k 100 μ L kompetentnih bakterijskih celic *E. coli*. Mešanico smo najprej inkubirali 30 minut na ledu, potem pa še 45 sekund v vodni kopeli pri 42 °C, da so celice sprejele plazmid. Epico smo prenesli nazaj na led za 2 minuti, nato pa ob gorilniku dodali 500 μ L LB tekočega medija in inkubirali 1 uro na 37 °C pri 177 RPM. Epico smo nato centrifugirali 5 minut na 3000 RPM, da so se bakterije usedle na dno. Iz epice smo odstranili 500 μ L supernatanta, 100 μ L usedline pa smo resuspendirali in prenesli na LBA trdno gojišče ter inkubirali čez noč pri 37 °C. Ponovili smo že prej opisane postopke: priprava bakterijske kulture z želenim plazmidom, izolacija plazmidne DNA - Miniprep, merjenje koncentracije plazmidne DNA - NanoDrop.

5.9 Določanje nukleotidnega zaporedja rekombinantne vektorske molekule

Nukleotidno zaporedje so določili v podjetju Eurofins. Vzorec se nanese na avtomatizirano napravo za določanje nukleotidnega zaporedja. Ločevanje in analiza potekata nekaj ur, izpis pa je v obliki elucijskega diagrama z barvno označenimi 4 nukleotidi. Računalniški program prevede elucijski diagram v enočrkovno nukleotidno zaporedje. Ključen je izbor začetnih oligonukleotidov. Vedeti moramo, na katero verigo se bodo vezali, in izbrati primerno razdaljo od regije, ki jo določamo (slika 4).



Slika 4: Postopek molekulskega kloniranja CRISPR/Cas9 [17].

5.10 Transfekcija v humano celično linijo

Pripravljen genetski material smo v celice vnesli z uporabo PolyJet™ In Vitro DNA Transfection reagenta, ki omogoča visoko učinkovitost transfekcije v številne sesalske celice. Dan pred transfekcijo smo celice 293T nacepili na ploščo za gojenje celic. Za gojitveno ploščo z 12 luknjicami smo potrebovali $1 \cdot 10^5$ celic na luknjico, da smo na dan transfekcije zagotovili 80–90 % konfluentnost rasti celic, kot zahteva uporabljena metoda transfekcije. Na dan transfekcije smo transficirali sesalske celice po navodilih proizvajalca. Za pozitivno kontrolo smo celice transficirali s plazmidom z zapisom za GFP. Po 24 urah inkubacije pri 37 °C in 5 % CO₂ smo transficirane celice pogledali pod fluorescentnim mikroskopom.

Tabela 4: Reakcijska mešanica za transfekcijo.

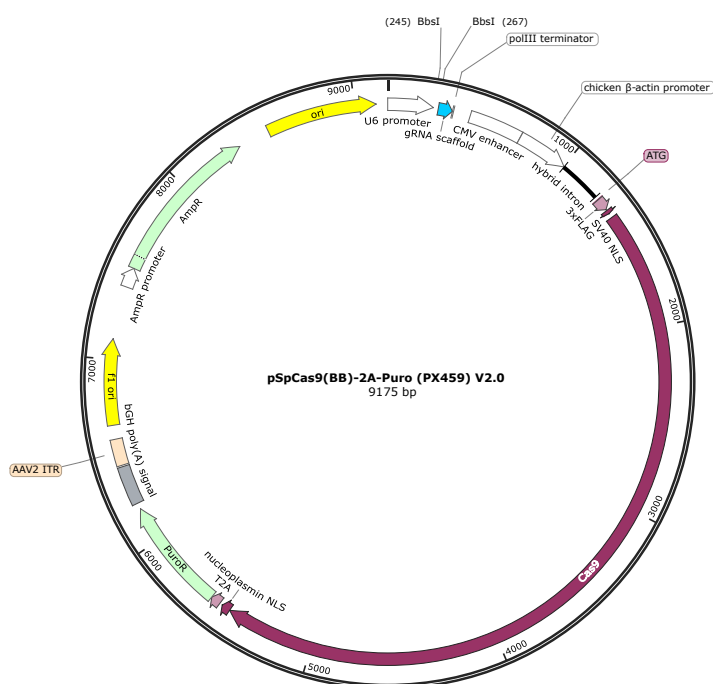
vdolbinica 1	25 μL DNEM + 1,8 μL vzorca 4 (500 ng pDNA)
vdolbinica 2	25 μL DNEM + 3,6 μL vzorca 4 (1000 ng pDNA)
vdolbinica 3	25 μL DNEM + 1 μL GFP (500 ng pDNA)
vdolbinica 4	75 μL DNEM + 3 μL PolyJet

6 Rezultati

6.1 Molekulsko kloniranje in delo z bakterijami

6.1.1 Plazmid pX459

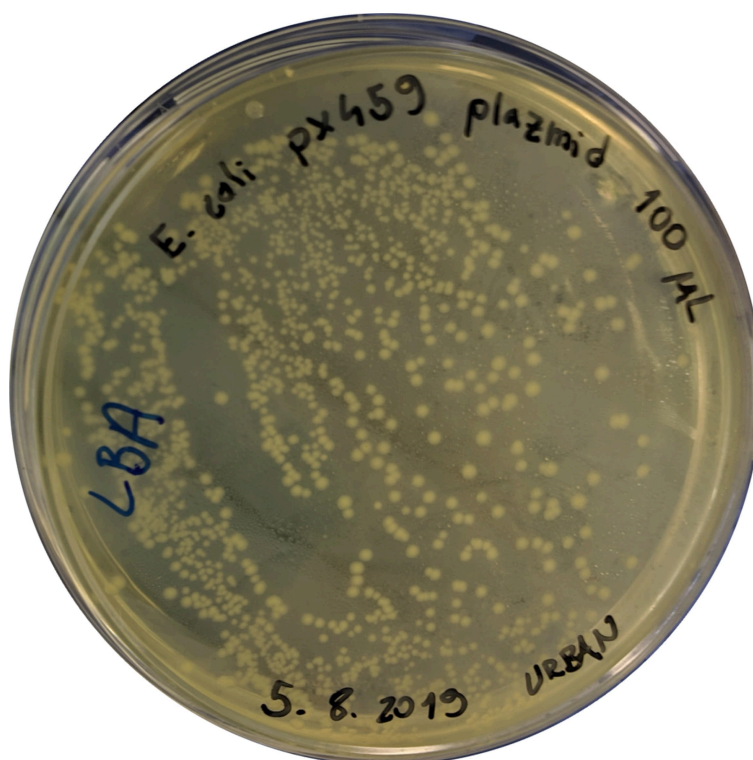
Plazmid pX459 je komercialen ekspresijski plazmid, velik 9200 baznih parov, ki omogoča izražanje rekombinantnih proteinov v sesalskih celicah. Nosi zapis za encim Cas9, zapis za rezistenco na antibiotik ampicilin in klonirno mesto za tarčno gRNA. Slika 5 prikazuje genetsko karto uporabljenega plazmida.



Slika 5: Plazmid pX459 vsebuje mesto začetka podvojevanja (ori), prisotnost dveh selekcijskih označevalcev - za ampicilin (AmpR) in puromicin (PuroR), zapis za encim Cas9 in klonirno območje za tarčno gRNA [18].

6.1.2 Bakterijska transformacija

Plazmid smo vnesli v kompetentne celice *E. coli* seva DH5 α . Kompetentne celice s plazmidom smo nanesti na trdno gojišče brez selekcijskega antibiotika in jih inkubirali čez noč na 37 °C (slika 6).



Slika 6: Bakterijske kolonije kompetentnih celic *E. coli* s plazmidom pX459 na trdnem gojišču.

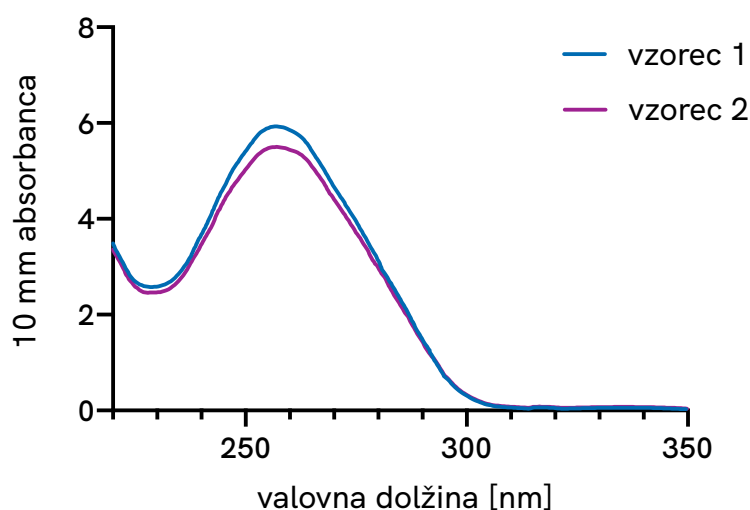
Naslednji dan smo dobro ločeno nastalo kolonijo prenesli v epruveto s tekočim gojiščem LBA, ki vsebuje tudi antibiotik ampicilin. Ta postopek smo ponovili za 2 koloniji. Pomembno je, da prenesemo le eno kolonijo, v kateri so vse bakterije genetsko enake, saj tako v primeru, da je bila transfekcija plazmida v prvotno bakterijo uspešna, dobimo največjo koncentracijo pDNA, če ni bila, pa lahko vzorec iz nadaljnjega poskusa izločimo, saj v njem ni bakterij.

6.1.3 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo po proizvajalčevem postopku izolirali iz bakterij in spektrofotometrično določili koncentracijo (tabela 5, graf 1).

Tabela 5: Rezultati spektrofotometrične analize po izolaciji pDNA.

	koncentracija pDNA	A260/A280	A260/A230
vzorec 1	293,5 ng/ μ L	1,88	2,25
vzorec 2	270,6 ng/ μ L	1,89	2,23



Graf 1: Spektrogram obeh vzorcev po izolaciji.

Nukleinske kisline imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm, zato lahko pri tej valovni dolžini neposredno določimo koncentracijo (graf 1).

Čistost raztopine lahko določimo z razmerjem absorbanc A260/A280, ki predstavlja kontaminacijo s proteini (razmerje 1,8 pomeni, da imamo v raztopini čisto dvovertično DNA), in A260/A230, ki predstavlja kontaminacijo s fenoli – pri čisti dvovertični DNA je ta vrednost večja od 2,0 (tabela 5).

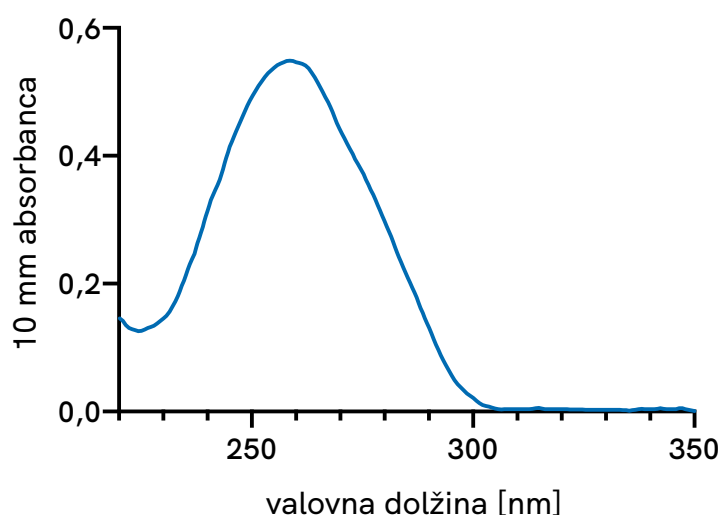
6.2 Kloniranje tarčne gRNA v plazmid pX459

6.2.1 Restrikcija plazmida

Z uporabo restriktivne endonukleaze BbsI, ki katalizira hidrolizo obeh verig DNA, smo izvedli restrikcijo plazmida pX459. Na plazmidu pX459 se zaporedje baz, ki jih ta prepozna, ponovi dvakrat, in sicer na začetku in koncu klonirnega mesta. Raztopino smo očistili po navodilih proizvajalca, da smo v nadaljnji reakciji kloniranja imeli samo raztopino lineariziranega plazmida. Koncentracijo DNA v tej smo določili na spektrofotometru (tabela 6, graf 2).

Tabela 6: Rezultati spektrofotometrične analize raztopine očiščenega lineariziranega plazmida.

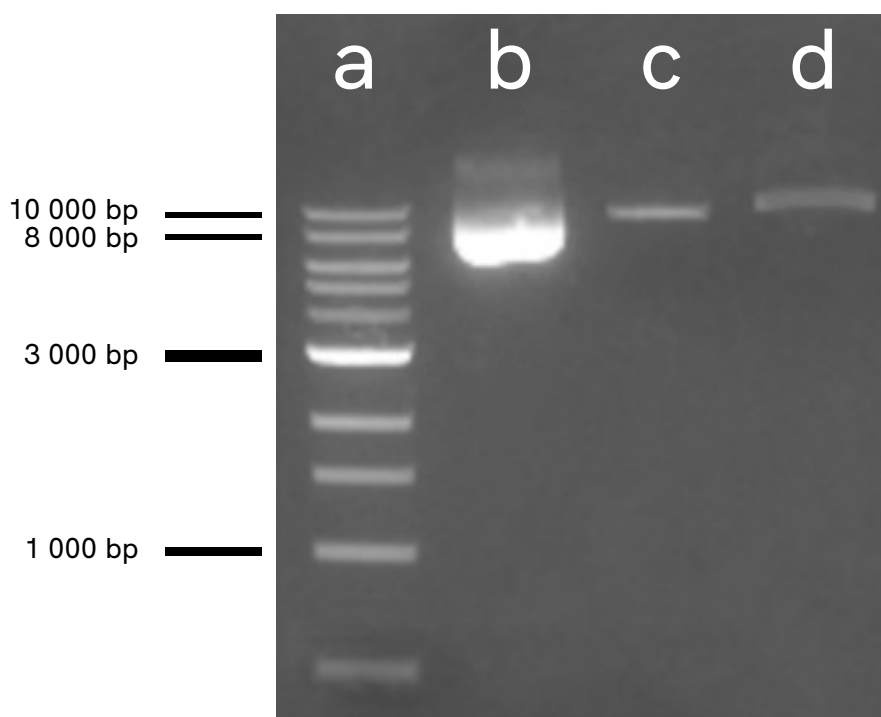
	koncentracija pDNA	A260/A280	A260/A230
vzorec	27,2 ng/ μ L	1,87	3,78



Graf 2: Spektrogram vzorca po restrikciji.

6.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Da smo preverili uspešnost restrikcije plazmida, smo izvedli elektroforezo, na katero smo nanesti nerazrezan plazmid, razrezan plazmid in razrezan očiščen plazmid ter standard, ki vsebuje odseke DNA različnih molekulskih mas. Pri nerazrezanem plazmidu vidimo več črt. Razlog je v tem, da se krožna DNA lahko nahaja v več konformacijah, ki se razlikujejo po hidrodinamski obliki, in zato je njihova gibljivost kljub enaki molekularni masi različna. Restrikcija je bila uspešna, ker vidimo le eno ravno črto pri 9200 baznih parih, kolikor je velik tudi uporabljen plazmid. Tudi po čiščenju vidimo eno ravno črto, torej bi za nadaljnje reakcije lahko uporabili tudi neočiščen lineariziran plazmid (slika 7).



Slika 7: Elektroforezni gel pod UV svetlobo. Stolpec a predstavlja standard molekulskih mas (bp; bazni par), b nerazrezan plazmid, c razrezan plazmid in d razrezan očiščen plazmid.

6.2.3 Molekularno kloniranje po Gibsonu

Da smo v linearizirani plazmid vstavili zapis za tarčno gRNA, smo uporabili metodo molekularnega kloniranja po Gibsonu. Tehnologija se imenuje po raziskovalcu dr. Danielu G. Gibsonu in omogoča vstavljanje tarčnega zaporedja v eni reakciji. Mešanica vsebuje encim eksonukleazo, ki omogoča nastanek lepljivih koncev na plazmidu, DNA polimerazo, ki omogoča nastanek komplementarne verige in s tem dvovertično DNA, in DNA ligazo, ki katalizira tvorbo fosfodiesterških vezi.

V reakcijsko mešanico smo dodali še plazmidno DNA in fragment DNA, ki zapisuje za tarčno gRNA. Razrezana plazmidna DNA in insert imata lepljive konce, ki se prek vodikovih vezi povežejo. Tako smo dobili rekombinanten plazmid.

6.3 Pomnoževanje rekombinantnega plazmida

6.3.1 Bakterijska transformacija

Rekombinanten plazmid smo vnesli v kompetentne celice *E. coli*, da bi ga pomnožili. Celice s plazmidom smo na trdnem gojišču brez antibiotika inkubirali čez noč na 37 °C.

Nato smo na enak način kot v poglavju 6.1.2 izbrali 6 kolonij, ki smo jih prenesli v tekoče gojišče z ampicilinom, vsako v svojo epruveto. Nato smo jih inkubirali čez noč na 37 °C ob rahlem stresanju (177 RPM). Izločili smo enega od vzorcev, saj v njem ni bilo vidnih celic, kar je pomenilo, da bakterija, iz katere je nastala kolonija v tem vzorcu, ni sprejela plazmida.

6.3.2 Izolacija plazmidne DNA

Tako smo dobili 5 vzorcev bakterijskih celic z rekombinantnim plazmidom, ki smo ga želeli izolirati. Izolirali smo ga po proizvajalčevem postopku, nato pa smo s pomočjo spektrofotometra določili njegovo koncentracijo v vsakem izmed vzorcev (tabela 7).

Tabela 7: Rezultati meritev na spektrofotometru po izolaciji.

	koncentracija pDNA	A260/A280	A260/A230
vzorec 1	206,6 ng/ μ L	1,88	2,34
vzorec 2	218,1 ng/ μ L	1,88	2,35
vzorec 3	138,1 ng/ μ L	1,88	2,37
vzorec 4	275,2 ng/ μ L	1,88	2,31
vzorec 5	195,1 ng/ μ L	1,87	2,37

Vzorec 4 je vseboval najvišjo koncentracijo plazmidne DNA.

6.3.3 Sekvenčna analiza

5 μ L vsakega od petih dobljenih vzorcev pDNA smo poslali na sekvenciranje, ki nam omogoča identificiranje in določanje nukleotidnega zaporedja rekombinantne vektorske molekule. Dobljene rezultate smo primerjali z zaporedjem inserta (poglavje 5.7), da smo ugotovili uspešnost kloniranja.

Rezultati sekvenčne analize so prikazani v tabeli 8 (prikazan je samo odsek inserta). Celotne sekvence plazmidov so priložene v prilogi 1.

Tabela 8: Izseki sekvenčne analize. Z zeleno je označena popolna sekvenca tarčne gRNA, z rdečo pa je označena neuporabna, nepopolna sekvenca. Ustrezen plazmid (s pravilnim zaporedjem DNA) vsebujejo vzorci 2, 3 in 4.

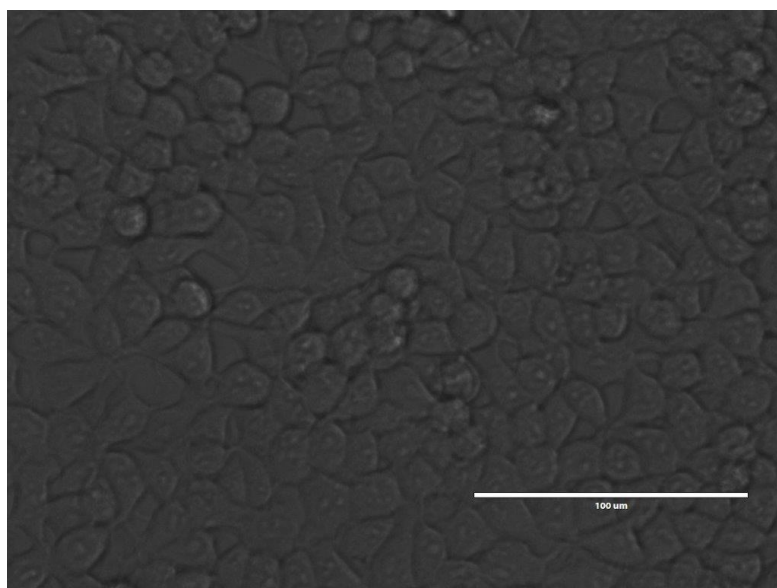
vzorec 1 5' - **GGTCTTCGAGAAGACCT** - 3'
vzorec 2 5' - **TATACTGAGGGGTCCACTAG** - 3'
vzorec 3 5' - **TATACTGAGGGGTCCACTAG** - 3'
vzorec 4 5' - **TATACTGAGGGGTCCACTAG** - 3'
vzorec 5 5' - **TATACTGAG** - 3'

6.4 Transfekcija plazmida v humane celice

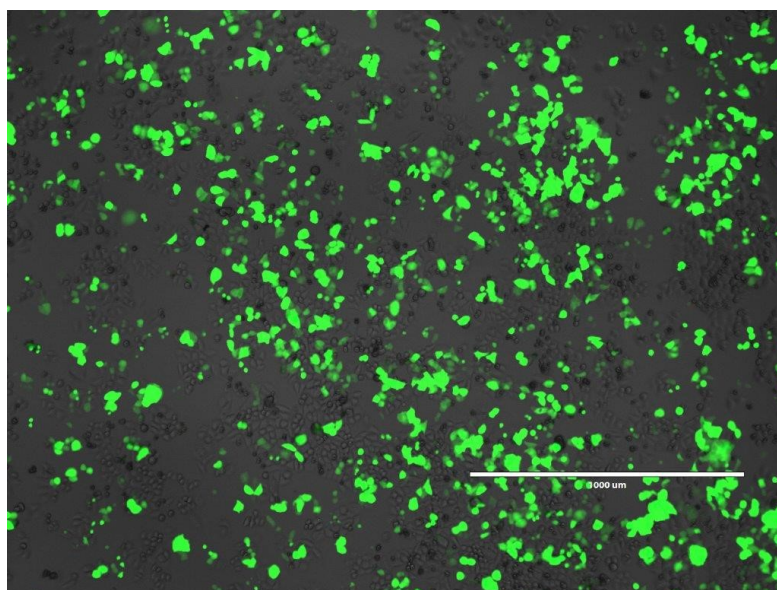
Po sekvenčni analizi je bil plazmid pripravljen za transfekcijo v humano celično linijo 293T, ki se pogosto uporablja za izražanje rekombinantnih proteinov.

Izbrali smo vzorec 4, ki je imel poleg pravilnega zaporedja tudi najvišjo koncentracijo pDNA. Plazmid smo s pomočjo PolyJet™ In Vitro DNA Transfection reagenta vnesli v celice (slika 8).

Da bi preverili uspešnost transfekcije, smo za pozitivno kontrolo uporabili plazmid z zapisom za zeleni fluorescentni protein (GFP, angl. »green fluorescent protein«), ki fluorescira pod vplivom UV-svetlobe. Zeleno fluorescentne celice smo opazovali pod fluorescentnim mikroskopom (slika 9).



Slika 8: Celice 293T transficirane z rekombinantnim plazmidom za utišanje gena *FUBP3* pod vidno svetlobo pri 40-kratni povečavi.



Slika 9: Celice 293T (pozitivna kontrola) pod fluorescentnim mikroskopom pri 4-kratni povečavi. Vidne so zeleno fluorescirajoče celice, ki so sprejele plazmid z zapisom za GFP.

7 Zaključek

V okviru raziskovalne naloge smo pripravili rekombinantne molekule DNA, ki vključujejo kratka zaporedja RNA (gRNA) za utišanje gena *FUBP3*. Spoznali smo se z osnovnimi tehnikami molekulskega kloniranja in tehnikami rekombinantne DNA. Uporabili smo najsodobnejše tehnike kloniranja po Gibsonu in tehnike utišanja genov z metodo CRISPR/Cas9.

Naloga je del večjega projekta, kjer bodo rezultate (pripravljene plazmidne konstrukte) te naloge uporabili za pripravo matičnih celic z utišanim genom *FUBP3*, da bi odkrili njegovo funkcijo delovanja v povezavi s kostnimi boleznimi. *FUBP3* je na novo odkrit gen, ki naj bi bil povezan z nastankom osteoporoze. Predstavlja potencialno tarčo za njeno diagnostiko in zdravljenje.

Z metodo molekulskega kloniranja CRISPR/Cas9 smo uspešno pripravili plazmidni konstrukt za utišanje gena *FUBP3* v humanih celicah in tako potrdili postavljeno hipotezo.

Poleg tega, da smo v nalogi predstavili novejšo metodo molekulskega kloniranja, bodo naši rezultati dodatno pomembno prispevali k razumevanju patologije nastanka kostnih bolezni.

Literatura

- [1] Primrose, S. B. in Twyman, R. *Principles of gene manipulation and genomics*. John Wiley & Sons, 2013.
- [2] Murat, D., Byrne, M. in Komeili, A. »Cell biology of prokaryotic organelles«. V: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2.10 (2010), a000422.
- [3] Allers, T. in Mevarech, M. »Archaeal genetics—the third way«. V: *Nature Reviews Genetics* 6.1 (2005), str. 58.
- [4] Forterre, P. »The common ancestor of archaea and eukarya was not an archaeon«. V: *Archaea* 2013 (2013).
- [5] Raspor, P. *Biotehnologija: Osnovna znanja*. Bia, 1996.
- [6] Salmond, G. P. in Fineran, P. C. »A century of the phage: past, present and future«. V: *Nature Reviews Microbiology* 13.12 (2015), str. 777.
- [7] Shintani, M., Sanchez, Z. K. in Kimbara, K. »Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy«. V: *Frontiers in microbiology* 6 (2015), str. 242.
- [8] Tsang, S. H. »Precision Medicine, CRISPR, and Genome Engineering«. V: *Switzerland: Springer Publishing* (2017), str. 1-178.
- [9] Hsu, P. D., Lander, E. S. in Zhang, F. »Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering«. V: *Cell* 157.6 (2014), str. 1262-1278.
- [10] Barrangou, R. in Van der Oost, J. *CRISPR-Cas systems: RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. Springer, 2013.

- [11] *Palindromes in the genome*. <https://www.mpg.de/11823627/crispr-cas9-palindromes-structure>. Dostopano: 15. 4. 2020.
- [12] *CRISPR: Prokaryotic Adaptive Immune System*. <http://sites.tufts.edu/crispr/crispr-background/adaptive-immune-system>. Dostopano: 15. 4. 2020.
- [13] Sander, J. D. in Joung, J. K. »CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes«. V: *Nature biotechnology* 32.4 (2014), str. 347.
- [14] Platt, R. J. »CRISPR tool enables precise genome editing«. V: *Nature* 576.7785 (2019), str. 48-49.
- [15] Mahmoudian-sani, M.-R. in sod. »CRISPR genome editing and its medical applications«. V: *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32.2 (2018), str. 286-292.
- [16] Selle, K. in Barrangou, R. »CRISPR-Based technologies and the future of food science«. V: *Journal of food science* 80.11 (2015), R2367-R2372.
- [17] Hsieh, P. *Construction of an sgRNA-Cas9 expression vector via single-stranded DNA oligo bridging of double-stranded DNA fragments*. New England Biolabs, Inc.
- [18] Ran, F. A. in sod. »Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system«. V: *Nature protocols* 8.11 (2013), str. 2281.

Priloga 1

Rezultati sekvenčne analize

Z zeleno je označena popolna sekvenca tarčne gRNA, z rdečo pa je označena neuporabna, nepopolna sekvenca. Krepka pisava označuje celoten insert, ki se ujema s sekvenco na plazmidu ob restrikcijskem mestu.

Vzorec 1

```
GGGTATTTCGATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACAC
CGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA
TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
TTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG
TTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTAC
CCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA
CGACCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA
GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA
CCATGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTC
CCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTT
TGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGTCTGCCATCAATA
TGGATATGCCACATCGGATGGTTTAGGGCTGCGCCAGCCTCAAAA
GGTGCGGCCCGCGGCAAATCATAAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTGC
CTTGAAGGCGAGGGGGACTACTAGAGCCGCTGCACCAGTTTAGAAC
TAGTCGTGAATGCGATACCGCCACACGAATAA
```

Vzorec 2

GGGTTTTTCGATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACAC
CGTATACTGAGGGGTCCACTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGG
TGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
CCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGG
TACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTT
TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTG
GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGACC
TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCAT
CTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTA
TTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCCTGGAGCC
AGACCGGCCGTAGACTCTCTAAATGGTAACACTTATCAATACGCGGA
GGAGAAGCGGCGGTGAGTAACACGGTGCGCCCGAAGTCTAACTTA
TCAGAGCCAGAGTCAAGCCAGTAGTCGACAGGGCCAGGGCGTTCCT
CGAGATCGCTGGGCATGTAGCCAGACACGTGAAACGCACCTACGCA
TCGGCATCACGTCTTCTACGGTCAAGTTCACTACACCTGAAACCGGG
AGATACGGCTCACATTTCTTAAAACCTTGATATTT

Vzorec 3

CTCCAGTTTTCAATTCTTGGCTTTTATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCGTATACTGAGGGGTCCACTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC
GGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTA
GTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGA
GGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG

CCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGCAAAGTACGCCCAC
TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
CGTCAATGACGGTAAATGGCTGACCTGGTATTGCGCCCAGTACATGA
CCTTATGGCACTTTTCTACTTGGTAGTACATCTCCGCAATATTCAACG
CTACTACCATGGGCGAAGGTGCAACCCAAGTTCTGCTTCATGCTCCC
CATCTCCCACCCCTCCCCAGCCCTAATTCTGTATTTATTTATTTTTTC
ACTATCTAGAGCACGGATGCGAGCTGCGGTAGTCGGTGGTGACACC
TCAAAGATAAATCTTTTAGCTTCAATTATAAATGATACTTAAACACACA
ATAATTCTGTCTCATGCCCCTCCCCCATGTCTATCCTTATAAAAAGG
TACGA

Vzorec 4

GGGGTTTCGATTCTTGGCTTTTATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC
GTATACTGAGGGGTCCACTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGT
GCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
CGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGT
ACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC
AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
TACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCT
CCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATT
TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGAGATCACTGCAT
GCATACTAATAAACGACTAGACGATCAGTCACTCATCGTGATACGTTA
AGTGCTGACATGCTAACAATATCCTGTACGCTTCCAATGCGTTAAGA
GTCTCACTCCTCACTTGCAGACCACAGACACTACCTCTGCCATTGTC

CGCTCATCGATAAATCTAAGCATCTACACCGCTACACAAGAAGTGCG
GGTCTCCTCATCTGCCCTCAAGGTCAACAGATCTGAGAGAATATTCT
CCTCTTCATTCCGAAAGCTCTCACATCATACTCGATAGAAACCGCCT
GAAATTCACTTGTACGCCCTATTATTTCCGAAAAATCCCATAGCAACG
CACCGTAATACCCCCCGAATAACGGGCGACAAGCTTTGACCCGGTA
TTTCTTCAGAACCATTAAACCGGCTAAATTAATGCAAGGTTTTTTAACT
CTCCTTTTTTTTTTTGCCAGCCCTTTAAAACCTTTTATTAACTACAAT
ACCCCTTTTTTCCCCCTCCCCAGGACAGTTTTCTCTTTTTAAAAAAG
CTTTTTTGGGTTTAAATTTATAAAAAATCCCTCAAATAATTTGGCCTTC
TTATACCGAGGGAGTTATGAGGGGAGAATCTCCGGCCCTAAATAACA
ATTTAAGAAAATTGTGGCGAGAAGAAATATTTTGTCTCTCCCCCCTT
ATCCTGTTGAGAAATAATATACTCTCTCTCCGTAGGTGAACAGAAA
AGGATCCCCTCCTACTCACA

Vzorec 5

GTTTTCGATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
TATACTGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGT
AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGC
GTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
TGGCCCGCCTGGCATTGTGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCTGA
GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCC
CCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGA
TGGGGGCGGGGGGGGGAGGGGGGCACGCGCCAAGCGGGTTCGG