Sortiranje genetički modificiranih stanica FreeStyle 293-F pomoću magnetnih kuglica konjugiranih sa streptavidinom

Franić, Dina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:401907

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dina Franić

Sortiranje genetički modificiranih stanica FreeStyle 293-F pomoću magnetnih kuglica konjugiranih sa streptavidinom

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za Epigenetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Iskreno hvala mentoru doc. dr. sc Aleksandru Vojti koji me strpljivo i s puno razumijevanja vodio kroz izradu i pisanje ovog diplomskog rada. Zahvaljujem mu se na svim konstruktivnim kritikama i stručnim savjetima.

Veliko hvala mag. biol. mol. Goranu Josipoviću uz čiju sam pomoć stekla znanja i vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju. Hvala za strpljenje i odgovore na sva moja pitanja.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Petri Korać na velikodušnoj pomoći i pristupačnosti. Iskreno hvala za sve savjete i pruženu potporu.

Hvala mag. biol. mol. Stjepanu Rakitiću što me poučio vještinama rada u laboratoriju.

Želim se zahvaliti i svim kolegama iz Laboratorija za Epigenetiku koji su mi s prijateljskim raspoloženjem uvijek bili spremni pomoći.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju da kao dio istraživačke grupe Laboratorija za Epigenetiku izradim ovaj diplomski rad.

Od srca se zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji. Hvala im za svu pruženu ljubav i podršku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Sortiranje genetički modificiranih stanica FreeStyle 293-F pomoću magnetnih kuglica konjugiranih sa streptavidinom

Dina Franić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

S ciljem unapređenja sortiranja genetički promijenjenih stanica nedavno je razvijena varijanta sortiranja pomoću magneta. Ona zahtjeva da vektor za genetičku manipulaciju stanica kodira za rekombinantni protein SBP-ΔLNGFR (od engl. *Streptavidin Binding Peptide - Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor*) koji nakon ekspresije lokalizira na membranama stanica. Njegov streptavidin vezujući dio (SBP) tada se usmjerava u izvanstaničan prostor te snažno veže streptavidin na magnetnim kuglicama kojima se vrši separacija stanica. Cilj ovog rada bio je sortirati transfeciranu populaciju stanica FreeStyle 293-F opisanom metodom. Konstruirana su dva donorska plazmida, jedan s modulom SBP-ΔLNGFR, a drugi s mRuby3. Metodom *Golden Gate* kloniranja, oni su zajedno s modulima dCas9-DNMT3A i gRNA sastavljeni u plazmide kojima su transfecirane stanice. Uspješna transfekcija zabilježena je u 14.5% stanica detekcijom mRuby3 proteina. Metodom imunofluorescencije 24 sata nakon transfekcije potvrđena je lokalizacija SBP-ΔLNGFR na membranama stanica, dok nakon 48 i 72 sata njegova prisutnost više nije zabilježena. Stanice su sortirane prema protokolu *Miltenyi Biotec*: 24, 48 i 72 sata nakon transfekcije, no pozitivan ishod je izostao. Postupak je ponovljen variranjem nekoliko novih uvjeta separacije no također bezuspješno. S obzirom na negativan ishod sortiranja u raspravi rada predlažemo isprobati nove uvjete istog protokola kao i alternativan protokol s magnetnim kuglicama drugog proizvođača.

(44 stranica, 10 slika, 1 tablica, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: MACS, samocijepajući peptidi "2A", kloniranje
Voditelj: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević
izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Rad prihvaćen: 06. lipnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Sorting genetically modified FreeStyle 293-F cells with streptavidin conjugated magnetic beads

Dina Franić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

With the aim of improving genetically modified cell sorting, a variant of magnetic cell sorting has recently been developed. It requires that the vector for genetical manipulation of cells encode for the recombinant protein SBP-ΔLNGFR which is localized on the cell membrane. The protein's streptavidin binding site (SBP) is then directed to the extracellular space where it strongly binds streptavidin on the magnetic particles for cellular separation. The purpose of this paper was to sort transfected FreeStyle 293-F cells by the described method. Two donor plasmids were constructed, one with module SBP-ΔLNGFR and the other with mRuby3. By the Golden Gate cloning, they were assembled with dCas9-DNMT3A and gRNA into plasmids for transfection. Successful transfection was observed in 14.5% cells by detection of the mRuby3 protein. Twenty-four hours after transfection, the SBP-ΔLNGFR localization on cell membranes was confirmed by immunofluorescence, while after 48 and 72 hours its presence was not recorded anymore. Cells were sorted by *Miltenyi Biotec* protocol: 24, 48 and 72 hours after transfection but without positive outcome. The procedure was repeated by varying several other conditions but also without improvement. We propose to try out new conditions for cell separation of the same protocol as well as an alternative protocol with magnetic particles of another manufacturer.

(44 pages, 10 figures, 1 table, 27 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library
Key words: MACS, self-cleaving peptides "2A", cloning

Supervisor: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Reviewers: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević
izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Thesis accepted: June 06, 2019.

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Sortiranje genetički promijenjenih stanica 1

1.2 Fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica - FACS 1

1.3 Magnetski aktivirano sortiranje stanica – MACS 2

1.4 Plazmidi kao posrednici genetičke manipulacije 5

1.4.1 Koekspresija plazmidnih gena 5

1.4.2 CRISPR/Cas9 i dCas9-DNMT3A 7

1.4.3 Reporter gen mRuby3 9

1.4.4 SBP-ΔLNGFR 10

2 CILJ ISTRAŽIVANJA 12

3 MATERIJALI I METODE 13

3.1 Materijali 13

3.2 Metode 15

3.2.1 Opće metode u konstrukciji plazmidnih vektora 15

3.2.2 Konstrukcija donor plazmida s modulom MACS_G-block 17

3.2.3 Konstrukcija donor plazmida s modulom mRuby3 20

3.2.4 Konstrukcija finalnog plazmida metodom *Golden Gate* kloniranja 21

3.2.5 Održavanje stanica FreeStyle 293-F u kulturi 24

3.2.6 Transfekcija stanica FreeStyle 293-F 25

3.2.7 Detekcija SBP-ΔLNGFR na membranama transfeciranih stanica FreeStyle 293-F metodom imunofluorescencije 26

3.2.8 Magnetski aktivirano sortiranje populacije stanica FreeStyle 293-F nakon postupka transfekcije 26

4 REZULTATI 28

4.1 Pregled konstruiranih donor plazmida 28

4.1.1 Donor plazmid s modulom MACS_G-block 28

4.1.2 Donor plazmid s modulom mRuby3 28

4.2 Konstrukcija finalnih plazmida za transfekciju stanica FreeStyle 293-F 29

4.3 Detekcija transfeciranih stanica FreeStyle 293-F 31

4.4 Detekcija rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR u membranama stanicama FreeStyle 293-F metodom imunofluorescencije 32

4.5 Magnetski aktivirano sortiranje transfeciranih stanica FreeStyle 293-F 35

5 RASPRAVA 36
6 ZAKLJUČAK 39
7 LITERATURA 40
8 ŽIVOTOPIS 43

1 UVOD

1.1 Sortiranje genetički promijenjenih stanica

Genetičkom manipulacijom ljudskih stanica u kulturi mijenja se njihov nasljedni materijal s ciljem stvaranja i ispitivanja novih staničnih karakteristika. Taj proces nije u potpunosti efikasan zbog čega nasljedni materijal ne podliježe promijeni unutar svih stanica. Rezultat toga je formiranje heterogene stanične populacije s genetički promijenjenim i nepromijenjenim stanicama. Da bi se proučilo ponašanje i odgovor isključivo promijenjenih stanica bilo je potrebno usavršiti metode sortiranja i obogaćivanja pojedinih staničnih populacija. Zadatak tih metoda je izdvojiti promijenjene stanice u velikom prinosu i čistoći bez negativnog utjecaja na staničnu vijabilnost.

Vodeći pristupi u sortiranju genetički modificiranih stanica su fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica - FACS (od engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) i magnetski aktivirano sortiranje stanica - MACS (od engl. *Magnet-Activated Cell Sorting*) (Plouffe i sur. 2015). Zajedničko tim dvjema metodama je mogućnost sortiranja stanica prema jedinstvenom sastavu staničnih membranskih proteina. Iz tog razloga genetička manipulacija uz nova svojstva od interesa, stanicama mora dati i nov profil proteinskog sastava na površini stanične membrane. Dodavanjem visoko specifičnih biomolekula s afinitetom vezanja tih proteina, populacije pojedinih stanica poprimaju individualan profil obilježavanja što ih čini pogodnima za sortiranje. Najčešće upotrebljene biomolekule u tu svrhu su antitijela (Dainiak i sur. 2007).

1.2 Fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica - FACS

Sortiranje genetički promijenjenih stanica metodom FACS podrazumijeva označavanje stanica s fluorescentno obilježenim biomolekulama nakon čega se u uređaju za protočnu citometriju stanice sortiraju u različite spremnike na temelju fluorescentnih signala, a po potrebi i na temelju stanične veličine i granularnosti. Ovom metodom osim što se stanice mogu sortirati obilježavanjem membranskih proteina, jednako efikasno mogu se sortirati i obilježavanjem unutarstaničnih proteina.

Pozitivne značajke metode FACS su čistoća pročišćavanja do preko 99% bez ugrožavanja vijabilnosti stanica (Plouffe i sur. 2015) te velik prinos prilikom izolacije nisko zastupljenih stanica (kao primjerice izolacija fetalnih stanica iz uzorka krvi majke) (Wang i sur. 2000). Fluorescentno obilježene biomolekule danas su komercijalno dostupne za širok spektar proteina što ovu metodu čini lako primjenjivom za različite uzorke. Iako je još uvijek jedna od najšire upotrebljenih platformi za sortiranje stanica, ograničenja metode FACS su njegova cijena i složenost postupka. Kako bi se osigurala učinkovitost i čistoća sortiranih stanica za rukovanje opremom neophodno je i visoko obučeno osoblje (Plouffe i sur. 2015).

1.3 Magnetski aktivirano sortiranje stanica – MACS

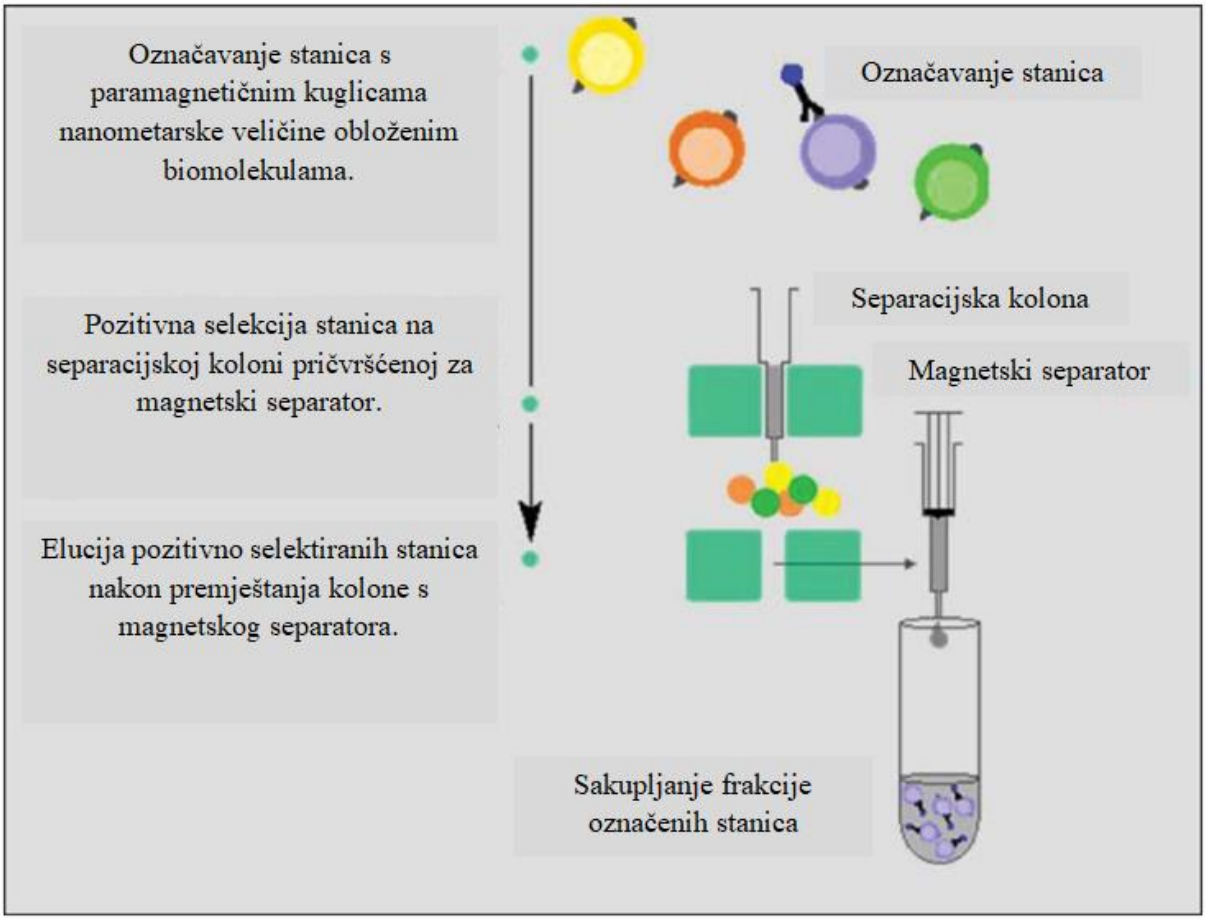
U usporedbi s metodom FACS, MACS je brža i jednostavnija metoda, pogodna za istovremenu obradu više uzoraka (Dainiak i sur. 2007, Miltenyi i sur. 1990), a njegova pristupačnost, niski troškovi i znatno manja oprema učinili su ga široko upotrebljenim u temeljnim ali i kliničkim ispitivanjima (Plouffe i sur. 2015). Iz tih je razloga MACS odabran kao metoda izolacije transfeciranih stanica u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada.

Izdvajanje genetički promijenjenih stanica metodom MACS temelji se na označavanju jedinstvenih membranskih proteina na površinama promijenjenih stanica biomolekulama pričvršćenim na paramagnetične kuglice nanometarske veličine. Površine stanica koje nisu uspješno genetički promijenjene ne obilježavaju se nanometarskim kuglicama jer nemaju ciljani membranski protein. Propuštanjem takvih stanica kroz kolonu za magnetsku separaciju, samo stanice s vezanim nanometarskim kuglicama ostaju imobilizirane na koloni. Prostrani matriks unutar kolone osigurava da sve ne označene stanice bez stvaranja agregata i drugih negativnih utjecaja na označene stanice lako napuste kolonu. Takav pristup sortiranja stanica naziva se pozitivna selekcije (Plouffe i sur. 2015). Po jednakom principu metoda MACS može biti prilagođena i za negativnu selekciju. U tom slučaju stanice koje nisu uspješno prošle genetičku manipulaciju u membranama moraju zadržati protein koji više neće biti prisutan u promijenjenim stanicama. Označavanjem i imobilizacijom nepromijenjenih stanica, stanice od interesa koje su uspješno genetički promijenjene bit će sakupljene kao frakcija koja nije zaostala na koloni.

Imobilizacija stanica moguća je zahvaljujući posebnoj građi separacijske kolone i jakom magnetskom polju. Kolona za separaciju ispunjena je matriksom od željeznih kuglica,

a njezinim smještanjem u magnetski separator, kuglice pojačavaju magnetski tok i do 10000 puta, zbog čega djeluje snažna magnetska sila koja će stanice označene i sa samo nekoliko nanometarskih kuglica zadržati na koloni. Jako magnetsko polje neophodno je u ovom postupku, jer mali promjer paramagnetičnih nanometarskih kuglica stvara samo slabu magnetsku silu, nedovoljnu za samostalnu imobilizaciju stanica na koloni. Naposljetku, premještanjem separacijske kolone izvan jakog magnetskog polja, označene stanice više ne zaostaju na koloni te se eluiraju kao pročišćena stanična suspenzija (Slika 1) (Grützkau i Radbruch 2010). Ovaj postupak dopušta minimalno označavanje željenih stanica zbog čega mnogo površinskih epitopa ostaje slobodno. To je važno jer preveliki broj vezanih kuglica po pojedinačnoj stanici, može uzrokovati aktivaciju novih signalnih puteva i tako promijeniti ekspresiju staničnih gena. Zbog toga bi se nakon separacije mogao dobiti pogrešan uvid o staničnom ponašanju i vijabilnosti (Øren i sur. 2005). Kako bi se izdvojene stanice oslobodile tog stresa, njihovom inkubacijom u reagensima za odstranjivanje kuglica ali i sam biorazgradiv materijal od kojega su nanometarske kuglice napravljene, omogućuju stanicama brz oporavak i njihovu daljnju primjenu nakon separacije.

Sortiranje stanica metodom MACS može biti napravljeno i bez kolone za magnetsku separaciju. U tom slučaju stanice je potrebno označiti znatno većom količinom kuglica mikrometarske veličine. Posljedica toga je nespecifično označavanje stanica kao i već spomenuta aktivacija novih signalnih puteva koje mogu dovesti do promjena u staničnim karakteristikama (Øren i sur. 2005).



Slika 1: Tehnologija magnetski aktiviranog sortiranja stanica - MACS. Preuzeto i izmjenjeo iz Grützkau i Radbruch 2010.

Iz dosadašnje primjene metoda FACS i MACS ne može se jednoznačno odrediti koja je veće efikasnosti. Pokazano je da uspješnost metode ovisi i o samoj vrsti heterogene stanične populacije koja se želi sortirati (Kerényi i sur. 2016, Shibata i sur. 2006), stoga ako su znanstvenicima obje metode jednako dostupne, poželjno bi bilo provjeriti postoje li u literaturi informacije o tome koja je od spomenutih metoda efikasnija za uzorak s kojim rade.

1.4 Plazmidi kao posrednici genetičke manipulacije

Jedni od najčešće upotrebljenih posrednika tijekom genetičke manipulacije su plazmidi - male cirkularne dvolančane molekule DNA. U njihovu okosnicu tehnologijom rekombinantne DNA ugrađuju se geni koji će stanicama dati nove karakteristike od interesa. Ranije je spomenuto da postupak genetičke manipulacije nije uvijek efikasan, zato je važno da se uz gene od interesa u plazmidnu okosnicu ugrade i geni koji će promijenjenim stanicama dati jedinstven i detektibilan fenotip prema kojemu će one biti izdvojene. Jednako tako, plazmidi moraju sadržavati i regulatorne elemente: pojačivače i promotore koji će regrutirati staničnu transkripcijsku mašineriju neophodnu za ekspresiju plazmidnih gena.

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada konstruirani su plazmidi s koordiniranom koekspresijom gena od interesa (dCas9-DNMT3A), reporter gena (mRuby3) i gena temeljem kojeg je napravljeno MACS sortiranje genetički promijenjenih stanica (SBP-ΔLNGFR). Idućih nekoliko odlomaka donosi pregled glavnih obilježja i sastavnica pripremljenih plazmida.

1.4.1 Koekspresija plazmidnih gena

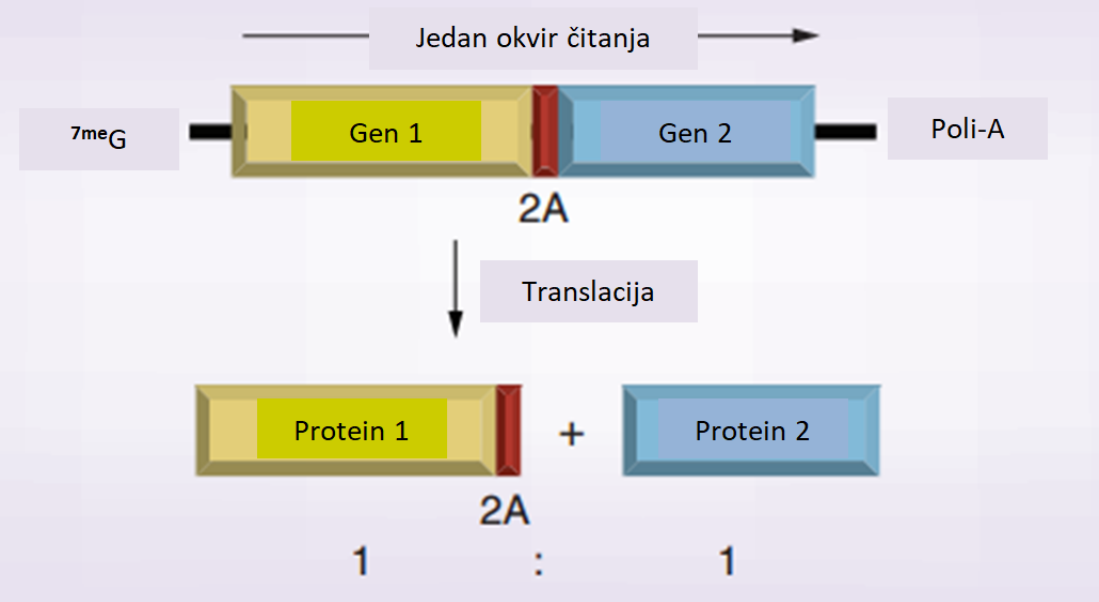
Koordinirana koekspresija više gena s jedne plazmidne DNA upotrebljena je da bi se s jednog promotora istovremeno eksprimiralo više gena. Taj sustav razvijen je po uzoru na RNA viruse s otkrićem kratkog samocijepajućeg oligopeptida "2A" u virusu slinavke i šapa (od engl. *Foot and mouth disease virus*) iz porodice *Picornaviridae*. Njegova je zadaća u inficiranoj stanici omogućiti proizvodnju više virusnih proteina iz jedne policistronske mRNA (Slika 2) (Luke i Ryan 2013).

Sekvence oligopeptida 2A odjeljuju virusne gene prepisane u policistronsku mRNA. Nakon sinteze prvog proteina u nizu započinje sinteza samocijepajućeg oligopeptida 2A. Njegov prvi dio interagira s izlaznim kanalom ribosoma, zbog čega se u peptidil transferaznom centru blokira sinteza peptidne veze između posljednjih aminokiselina – glicina i prolina na C-terminalnom kraju oligopeptida 2A. Prirodno prisutni faktori otpuštanja eRF1 i eRF3 (od engl. *Eukaryotic translation termination factor 1 i 2*) oslobađaju do tada sintetiziran peptidni lanac nakon čega se na ribosomima neometano nastavlja translacija nizvodnog dijela mRNA molekule. Efikasna ekspresija većeg broja plazmidnih gena međusobno povezanih samocijepajućim oligopeptidima 2A moguća je u svim staničnim

tipovima jer aktivnost cijepanja oligopeptida ovisi samo o ribosomu koji je strukturno očuvan u svim eukariotima (Luke i Ryan 2013).

Sekvence slične 2A oligopeptidu otkrivene su i u drugim virusima unutar porodice *Picornaviridae*. Tako su za koordiniranu koekspresiju plazmidnih gena u ovom diplomskom radu odabrane upravo sekvence samocijepajućih oligopeptida P2A podrijetlom iz *Porcine Teschovirus-1 2A* i T2A podrijetlom iz *Thosea Asigna Virus 2A* (Wang i sur. 2015).

Jedini nedostatak ovog ekspresijskog sustava je zaostajanje fragmenta 2A oligopeptida na C-terminalnom kraju uzvodnog proteina te zaostajanje prolinskog ostatka vezanog na N-terminalni kraj nizvodnog proteina (Luke i Ryan 2013, Wang i sur. 2015). Iako N-terminalni prolin može dati dug poluživot proteinu, on isključuje mnoge N-terminalne post-translacijske modifikacije koje mogu biti važne za njegovu aktivnost. Ako je to slučaj, takav protein treba staviti prvi u lanac spojenih sekvenci jer oligopeptidni ostatak na C-terminalnom kraju uglavnom ne ometa funkciju proteina (Luke i Ryan 2013).



Slika 2: Mehanizam koekspresije gena sa samocijepajućim oligopeptidom 2A. Kodirajuće sekvence gena 1 i 2 povezane su u jedan policistronski konstrukt putem 2A linkera. Njihovom translacijom sintetiziraju se proteini u stehiometrijskom omjeru 1:1. Jedini negativan utjecaj takve koekspresije je zaostajanje uzvodnog produžetka 2A oligopeptida na C-terminalnom kraju uzvodnog proteina te zaostajanje prolina na N-terminalnom kraju nizvodnog proteina. Preuzeto i izmijenjeno iz Luke i Ryan 2013.

1.4.2 CRISPR/Cas9 i dCas9-DNMT3A

Prema mehanizmu adaptivne bakterijske imunosti u vrsti *Streptococcus pyogenes*, razvijen je do sada najmoćniji molekularni alat za ciljanu genomsku manipulaciju CRISPR/Cas9 (od engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/ CRISPR associated protein 9*) (Jinek i sur. 2012).

U bakterija, zadaća CRISPR/Cas sustava je zapamtiti, a onda i razviti obranu na patogene koji su u njoj prouzročili infekciju. Mehanizam takve obrane obavljaju: CRISPR lokus, 4 Cas gena (Cas9, Time1, Time2 i CSN2) i tracrRNA (od engl. T*ransactivating CRISPR RNA*) (Heler i sur. 2015). Razvitak bakterijske imunosti započinje procesom adaptacije. Tijekom njega se u CRISPR lokus ugrađuje 30-ak nukleotida dug slijed podrijetlom iz genoma patogena koji je prouzročio infekciju. Inače, CRISPR lokus sastavljen je od 30-ak nukleotida dugih ponavljanja isprekidanih s 30-ak nukleotida dugim sljedovima podrijetlom iz genoma patogena na koje je bakterija već stekla otpornost (Marraffini 2016).

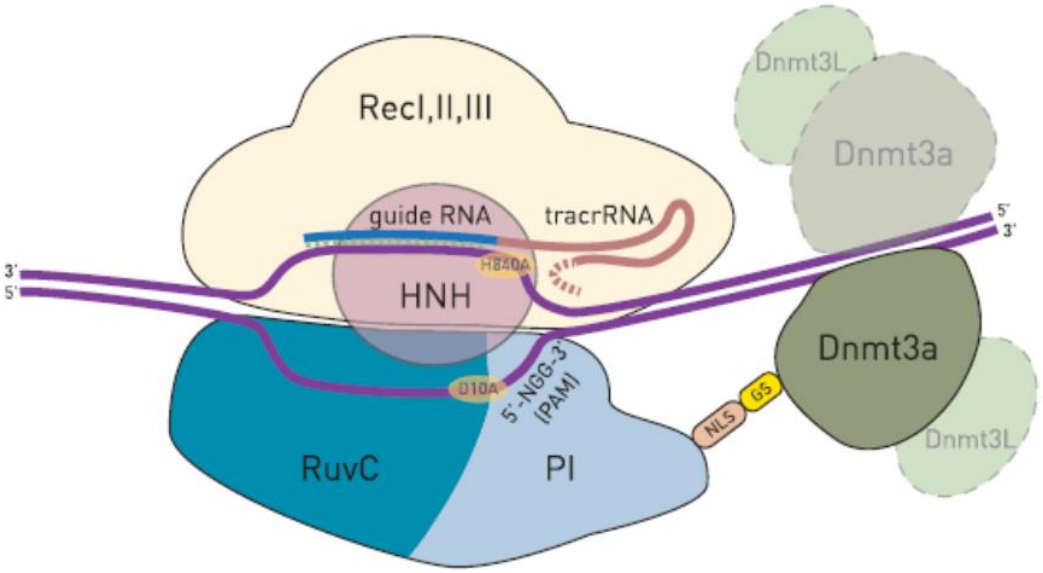
Idući korak u postizanju bakterijske imunosti je faza ekspresije. Tijekom nje se formira aktivan DNA endonukleazni kompleks sastavljen od Cas9 endonukleaze, crRNA (od engl. *CRISPR RNA*) prepisane s CRISPR lokusa i tracrRNA uključene u njezino sazrijevanje. U tom kompleksu zadaća crRNA je prepoznati odgovarajući fragment na stranoj DNA dok je zadaća Cas9 endonukleaze prepoznati 3 nukleotida dugačak motiv 5′-NGG-3′ (gdje je N bilo koji nukleotid, a G gvanin) nazvan PAM sekvenca (od engl. *Protospacer adjacent motif*) koji je udaljene nekoliko nukleotida od mjesta prepoznavanje crRNA (Ran i sur. 2013). Nakon efikasnog prepoznavanja, Cas9 s dvije endonukleazne domene RuvC i HNH stvara dvolančani lom u stranoj DNA i tako bakteriju lišava patogena (Savell i Day 2017).

Usavršavanjem opisanog mehanizma razvijen je trenutno najmoćniji alat za genomsku manipulaciju. Njegova je zadaća uvesti ciljane dvolančane lomove u genomskoj DNA i tako otvoriti mogućnost specifične izmjene nasljednog materijala. Poznato je da se u ljudskim stanicama dvolančani lomovi na genomskoj DNA popravljaju ili direktnim povezivanjem pocijepanih krajeva - NHEJ (od engl. *Non-Homologous End Joining*) ili popravkom po uzoru na homologno područje sestrinske kromatide - HDR (od engl. *Homology-Directed Repair*). Direktnim povezivanjem uglavnom nastaju nepredvidive indel (insercija/delecija) mutacije zbog čega se taj oblik popravka favorizira za ciljano utišavanje gena. S druge strane, unosom nove sekvence s krajevima homolognim prouzročenom dvolančanom lomu, u stanicama se

favorizira popravak po uzoru na homologno područje što rezultira pojavom novog nukleotidnog slijeda u genomskoj DNA (Ran i sur. 2013).

CRISPR/Cas9 alat za ciljanu genomsku manipulaciju sastavljen je od dvije komponente - Cas9 endonukleaze i kimerne gRNA molekule (od engl. *guide RNA*) dobivene fuzijom prirodno prisutnih crRNA i tracrRNA. Funkcija mu je izazvati cijepanje oba lanca genomske DNA na ciljanom području i tako otvoriti mogućnost genomske manipulacije bilo kroz NHEJ ili HDR oblik popravka. Dizajniranjem sintetskih gRNA te zahvaljujući prirodnoj rasprostranjenosti motiva PAM svakih 8-12 pb u ljudskom genomu, ovaj kompleks može precizno prepoznati bilo koji lokus eukariotskih stanica (Jinek i sur. 2012).

CRISPR/Cas9 tehnologija se osim za uređivanje genoma sve se češće koristi i za ciljanu epigenetičku manipulaciju te gensku regulaciju. Vezanjem efektorskih domena transkripcijskih regulatora na Cas9 s deaktiviranim endonukleaznim domenama - dCas9 (od engl. *dead Cas9*) razvijeni su kimerni konstrukti za epigenetičku manipulaciju (Pulecio i sur. 2017). Tako je i fuzijom dCas9 s katalitičkom domenom *de novo* DNA metiltransferaze 3A - DNMT3A (od engl. *DNA methyltransferase 3 alpha*), razvijen kimerni konstrukt dCas9-DNMT3A, odnosno alat za ciljanu metilaciju genoma (Slika 3) (Vojta i sur. 2016). DNA metilacija predstavlja nasljednu epigenetičku oznaku koja nastaje kad DNA metiltransferaze (DNMT) kovalentno vežu metilnu skupinu na peti C atom citozina unutar DNA molekule. Ovakva promjena mijenja strukturu DNA zbog čega se mijenja i njezina interakcija s transkripcijskom mašinerijom. Veliki broj procesa kao što su utišavanje gena, genomski imprinting, inaktivacija X kromosoma te utišavanje ponavljajućih elemenata koreliraju s DNA metilacijom. Sam proces je visoko specifičan, te se u stanicama kralješnjaka događa na citozinu koji prethodi gvaninu unutar CpG mjesta (od engl. *Cytosine-phosphate-guanine*) (Jin i Liu 2018). Taj alat danas se upotrebljavaju u temeljnim istraživanjima genske ekspresije i strukture kromatina. Tako je u ovom diplomskom radu pripremljen plazmid s modulom dCas9-DNMT3A koji je u stanicama vršio ciljanu metilaciju unutar promotora gena *BACH2*. Iako u ovom radu nije napravljena analiza metilacijskog statusa tog promotora, pripremljeni plazmid može biti upotrebljen s tom svrhom u daljnjim istraživanjima.



Slika 3: Shematski prikaz fuzijskog konstrukta dCas9-DNMT3A u kompleksu s gRNA i ciljnim DNA slijedom. Fuzioniranjem neaktivne dCas9 endonukleaze s katalitičkom domenom DNMT3A putem Gly_4Ser linkera razvijen je alat za ciljanu metilaciju CpG mjesta. Po uzoru na CRISPR-Cas9 alat za ciljanu genomsku modifikaciju, gRNA molekula komplementarnim sparivanjem s genomskom DNA navodi taj konstrukt na područje gdje će DNMT3A svojom aktivnošću vrši ciljanu metilaciju.

Pojašnjenje kratica. Domene Cas9 proteina: režnjevi prepoznavanja RecI, II i III, endnukleazne domene HNH, RuvC i PI (od engl. *PAM-interacting domain*) koja prepoznaje sekvencu PAM; NLS signal jezgrine lokalizacije (od engl. *Nuclear Localization Signal*); GS, Gly_4Ser peptidni linker; katalitička domena DNMT3A u *in vivo* uvjetima regrutira endogene proteine za dimerizaciju: DNMT3A i DNMT3L. Preuzeto iz Vojta i sur., 2016.

1.4.3 Reporter gen mRuby3

Reporter geni kao sastavni dijelovi ekspresijskih plazmida pokazuju jesu li stanice podvrgnute genetičkoj manipulaciji uspješno primile i eksprimirale stranu DNA. Sekvence reporter gena ugrađuju se pod zajedničku transkripcijsku kontrolu s genom od interesa čime se oba gena istovremeno eksprimiraju u stanicama. Iz tog razloga, detekcijom produkta reporter gena u stanicama se dokazuje i neposredna ekspresija gena od interesa.

Fluorescentni proteini često su upotrebljeni reporter geni. Oni nemaju štetan utjecaj na stanični metabolizam, a mogu se lako detektirati fluorescentnom mikroskopijom. Tako je prilikom konstrukcije plazmida u ovom diplomskom radu za reporter gen odabran crveni

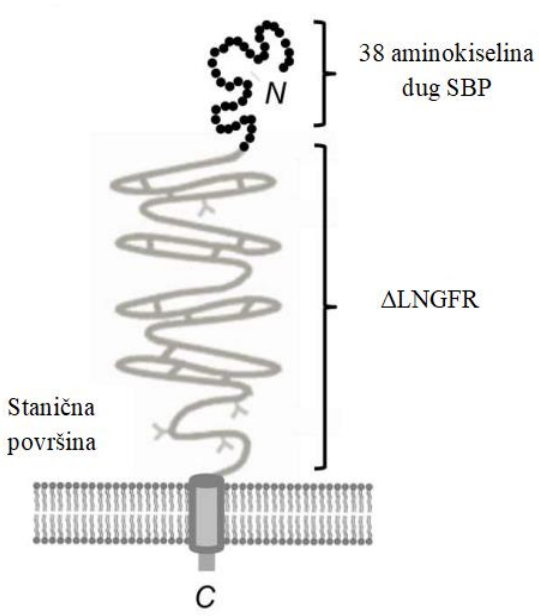
fluorescentni protein mRuby3. On je razvijen ciljanom mutagenezom kao poboljšana inačica svojeg prethodnika mRuby2 (Bajar i sur. 2016). Karakteristike su mu povećana fotostabilnosti i jači intenzitet fluorescencije za 35%. Pod osvjetljenjem fluorescentnih lampi mRuby3 ima poluživot od 349 sekundi, što je čak 200% više od njegovog prethodnika mRuby2. Danas je mRuby3 najsvjetliji i najstabilniji monomerni crveni fluorescentni protein (Bajar i sur. 2016).

1.4.4 SBP-ΔLNGFR

Kako je ranije spomenuto, u ovom diplomskom radu napravljeno je sortiranje transfecirane populacije stanica metodom MACS. Jedinstveni profil vanjske površine stanične membrane transfeciranih stanica postignut je ekspresijom fuzijskog membranskog kompleksa sastavljenog od 38 aminokiselina dugog streptavidin vezujućeg peptida - SBP (od engl. *Streptavidin Binding Peptide*) pričvršćenog na N-terminalni kraja skraćene verzije receptora LNGFR (od engl. *Low Affinity Nerve Growth Receptor*) (Slika 4) (Matheson i sur. 2014). LNGFR je transmembranski glikoprotein, a njegov skraćen oblik bez citoplazmatske domene u kompleksu SBP-ΔLNGFR omogućuje orijentaciju SBP-a u izvanstaničan prostor. Uloga SBP-a je imitirati biotin i tako omogućiti čvrstu interakciju sa streptavidinom koji se nalazi na paramagnetičnim kuglicama za separaciju stanica.

Interakcija između streptavidina i biotina jedna je od najjačih nekovalentnih interakcija pronađenih u prirodi. Streptavidin je tetramerni biotin vezujući protein izvorno izoliran iz vrste *Streptomyces avidinii*. Unatoč njegovom velikom afinitetu za vezanje biotina pokazano je da u nekim uvjetima poput niskog pH ili visoke temperature njihova interakcija slabi. Zbog tih nedostataka izvorni oblik streptavidina unaprijeđen je ciljanom mutagenezom koja je pridonijela poboljšanoj mehaničkoj i termičkoj stabilnost interakcije streptavidina i biotina (Chivers i sur. 2010).

Naposljetku, jednako kao što magnetna sila zadržava nanokuglice na separacijskoj koloni, jaki afinitet vezanja između streptavidina na kuglicama i SBP-a na membranama transfeciranih stanica također uz nanokuglice zadržava i stanice na koloni. Tako se transfecirane stanice izdvajaju iz ostatka stanične populacije.



Slika 4: Rekombinantan membranski protein SBP-ΔLNGFR orijentiran prema izvanstaničnom prostoru namijenjen označavanju stanica s paramagnetičnim nanokuglicama konjugiranim streptavidinom. **Δ**LNGFR je modificiran transmembranski glikoprotein koji usmjerava SBP prema izvanstaničnom prostoru. Streptavidin na paramagnetičnim kuglicama u kontaktu sa stanicama koje sadrže SBP-ΔLNGFR, vežu SBP te kuglice ostaju pričvršćene za staničnu površinu, što stanice čini pogodnima za magnetsku separaciju. Preuzeto i izmijenjeno iz Matheson i sur. 2014.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj provedenog istraživanja bio je nakon postupka transfekcije, metodom magnetski aktiviranog sortiranja stanica - MACS izdvojiti uspješno transfecirane stanice FreeStyle 293-F od ostatka netransfecirane stanične populacije. U tu svrhu, metodom *Golden Gate* kloniranja sastavljeni su plazmidi za transfekciju stanica s kodirajućom sekvencom rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR. On je transfeciranim stanicama davao jedinstven profil vanjske površine stanične membrane temeljem kojeg je napravljeno sortiranje stanica.

Specifični ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Konstrukcija donor plazmida s modulom MACS_G-block sa sekvencom rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR.
- Konstrukcija donor plazmida s modulom za fluorescentni biljeg mRuby3.
- Sastavljanje finalnih plazmidnih konstrukata metodom *Golden Gate* kloniranja s koordiniranom koekspresijom gena: dCas9-DNMT3A, mRuby3 i SBP-ΔLNGFR te s molekulom gRNA. Jedan finalni konstrukt morao je imati dCas9-DNMT3A s aktivnom, a drugi s inaktiviranom katalitičkom domenom DNMT3A.
- Transfekcija stanica FreeStyle 293-F finalnim plazmidnim konstruktima.
- Određivanje efikasnosti postupka transfekcije vizualizacijom fluorescentnog biljega mRuby3.
- Vizualizacija SBP-ΔLNGFR metodom imunofluorescencije na membranama transfeciranih stanica 24, 48 i 72 sata nakon transfekcije.
- Izdvajanje transfeciranih stanica FreeStyle 293-F metodom MACS - 24, 48 i 72 sata nakon postupka transfekcije od ostatka ne transfecirane stanične populacije.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

Komercijalni setovi kemikalija

Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD); QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara, Tokio, Japan); ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, SAD); QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Enzimi i pridruženi puferi

XbaI (10 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); XhoI (10 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); 10× Cut Smart pufer (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); T4 DNA Ligaza (350 U/µL; Takara, Tokio, Japan); 10× T4 DNA ligacijski pufer (Takara, Tokio, Japan); NcoI (10 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, SAD); KasI (5 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); FastAP termosenzitivna alkalna fosfataza (1 U/µL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); 10× FastAP pufer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); BsaI (10 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); Egzonukleaza RecBCD (10 U/ µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); SphI (10 U/µL; New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); BpiI (10 U/µL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); T4 polinukleotid kinaza (10 U/µL; Takara, Tokio, Japan); 10× G pufer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Fosfatni pufer - PBS (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na2HPO4; 1.47 mM KH2PO4; pH 7.4)

Boje i markeri molekulskih masa

CSL-MDNA-100BPH marker (Cleaver Scientific, UK); Gel Loading Dye Purple 6× (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); 10000× GelGreen Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, SAD); 100 bp DNA ladder (Solis Biodyne, Tartu, Estonija); 10× CoralLoad Dye (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Plazmidi

pUK21gg (2657 pb); pUK21_FP_T2A_Ruby_G414A (3705 pb); pUK21_FP_T2A-X (3016 pb); tNS-pSg-G+mRuby (4339 pb); tNS-pPro-CBh (2) (3909 pb); pN-FD_DNMT3A-AKT (2) (3635 pb); pN-C9_SpCas9 (6924 pb); pUK21_FP_T2A-X_mRuby_(2) (3682 pb); pUK21_FP_X-P2A_MACS_(6) (3621 pb); tNS-pTer-H (3299 pb); pBB-Cl-noSV (2394 pb)

DNA odsječci i početnice

Odsječak DNA MACS_G-block (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD); Odsječak DNA sa sekvencom gRNA molekule (Macrogene, Seul, Južna Koreja); početnice (Macrogen, Seul, Južna Koreja)

Stanice

Escherichia coli soj XL10-Gold (Agilent, Santa Clara, SAD); suspenzijske stanice FreeStyle 293-F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Uređaji

Uređaj za elektroforezu PowerPac Basic (Bio-Rad, Hercules, SAD); Termoblok tresilica Mixer HC (StarLab, Milton Keynes, UK); Mini centrifuga Combi-SpinFVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija); Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); NanoVue uređaj (GE Healthcare Life Sciences, SAD); Uređaj za lančanu reakciju polimerazom Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD); transiluminator s plavim svjetlom UVI Blue (Uvitec, Cambridge, UK); Tresilica Orbital Shaker PSU-20i (BioSan, Riga, Latvija); Inkubator Panasonic MCO-230AICUV IncuSafe CO_2 (Panasonic Healthcare, Tokyo, Japan); Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); uređaj za automatsko brojanje stanica EVE (NanoEnTek, Južna Koreja); Invertni mikroskop IX73 (Olympus, Tokio, Japan)

Računalni programi

NEBioCalculator (New England BioLabs, Ipswich, SAD); SnapGene (GLS Biotech, SAD); ImageJ (National Institutes of Health, SAD)

Ostalo

Luria-Bertani (LB) tekući medij (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L BactoTrypton, 10 g/L NaCl); Luria-Bertani (LB) kruti medij (5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L BactoTrypton, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar); Agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); Pufer TAE (1mM Tris, 1mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0); Destilirana voda; Kanamicin (50 mg/mL); 10 mM ATP; Ampicilin (100 mg/mL; BioChemica, Darmstadt, Njemačka); IPTG - Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (100 mM; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); X-Gal (20 mg/mL); DTT (10 mM); 4% paraformaldehid (Agilent, Santa Clara, SAD); FreeStyle 293 hranjivi medij (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); FITC anti-human CD271 (NGFR) antitijelo (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD); Fluorescentna boja DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); Medij za održavanje fluorescencije Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Danska); Opti-MEM I medij (Gibco, Waltham, Massachusetts, SAD); Transfekcijski reagens 293fectin (Gibco, Waltham Massachusetts, SAD); labeling pufer (PBS, pH 7.2, 2 mM EDTA; Miltenyi Biotec, Bolonja, Italija); separacijski pufer (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2 mM EDTA; Miltenyi Biotec, Bolonja, Italija); Paramagnetične nanometarske kuglice obložene streptavidinom (Miltenyi Biotec, Bolonja, Italija): Magnetski separator MACS (Miltenyi Biotec, Bolonja, Italija)

3.2 Metode

3.2.1 Opće metode u konstrukciji plazmidnih vektora

3.2.1.1 Transformacija bakterijskog soja XL10-Gold metodom temperaturnog šoka

Kemijski kompetentne bakterijske stanice *E.coli* soja XL10-Gold transformirane su metodom temperaturnog šoka s produktima ligacijskih smjesa. Alikvoti bakterijskih stanica od 50 µl premješteni su s temperature pohrane od -80 ºC na led u trajanju od 10 min. Ligacijska smjesa i odgovarajuća negativna kontrola dodane su u bakterijske alikvote, uz ponovnu inkubaciju na ledu od 10 min. Bakterije su transformirane u termobloku 30 s, pri 42 ºC. Slijedio je oporavak stanica 2 min na ledu te im je dodano 450 µL tekućeg LB medija sobne temperature. Uzorci su inkubirani u termobloku 45 min pri 37 ºC i agitaciju od 750 rpm nakon čega je na jednu hranjivu podlogu od krutog LB medija s odgovarajućim antibiotikom (zajedno s drugim komponentama u slučaju *Golden Gate* kloniranja) nasađeno 50 µL uzorka,

a na drugu 50 µL negativne kontrole. Slijedila je inkubacija 16 h na 37 ºC. Ovakvom selekcijom omogućen je rast samo transformanti rezistentnih na antibiotik iz podloge, odnosno samo onih bakterijskih stanica koje su primile konačni plazmid. Nekoliko bakterijskih kolonija nasumično je izabrano za analizu metodom *colony* PCR.

3.2.1.2 *Colony* PCR

Reakcijska smjesa za *colony* PCR pripremljena je prema protokolu *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* u konačnom volumenu od 25 µL. U računalnom programu *SnapGene* odabrane su početnice, napravljena je simulacija mjesta njihovog vezanja i predviđeni su pozitivni rezultati. Produkti reakcije analiziranu su elektroforezom na gelu agaroze.

3.2.1.3 Elektroforeza na gelu agaroze

Detekcija PCR i *colony* PCR produkata napravljene su u 1% gelu agaroze. Gel je pripremljen otapanjem agaroze u TAE puferu pri temperaturi vrenja. Otopina je hlađena 30 s ispod mlaza hladne vode nakon čega je obojena *GelGreen Nucleic Acid Gel Stain* bojom (1:10000) i izlivena u kalup za polimerizaciju u gel. Polimerizacija je trajala 20 min. Gel je premješten u kadicu za elektroforezu s TAE puferom i na njega su naneseni uzorci. Elektroforeza je provedena pri jakosti električnog polja od 10 V/cm nakon čega su na transiluminatoru s plavim svjetlom (470 nm) vizualizirane vrpce DNA u gelu agaroze.

3.2.1.4 Izolacija rekombinantnih plazmida

Nakon vizualizacije produkata metode *colony* PCR, detektirane su pozitivne kolonije i pripremljene su prekonoćne kulture u LB mediju s odgovarajućim antibiotikom. Prekonoćne kulture inkubirane su na tresilici, 16 h pri 37 ºC. Iz umnoženih bakterijskih stanica izolirani su rekombinantni plazmidi sa setom *ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit*. Koncentracija i čistoća izoliranih DNA određene su mjerenjem apsorbancije na 260 nm i 280 nm uređajem NanoVue. Rekombinantni plazmidi provjereni su sekvenciranjem Sangerovom metodom.

3.2.1.5 Ostale napomene

- Količine inserta i vektora za ligaciju u odgovarajućim molarnim omjerima izračunate su u računalnom programu *NEBioCalculator* unošenjem veličine inserta i vektora u pb (parovima baza).

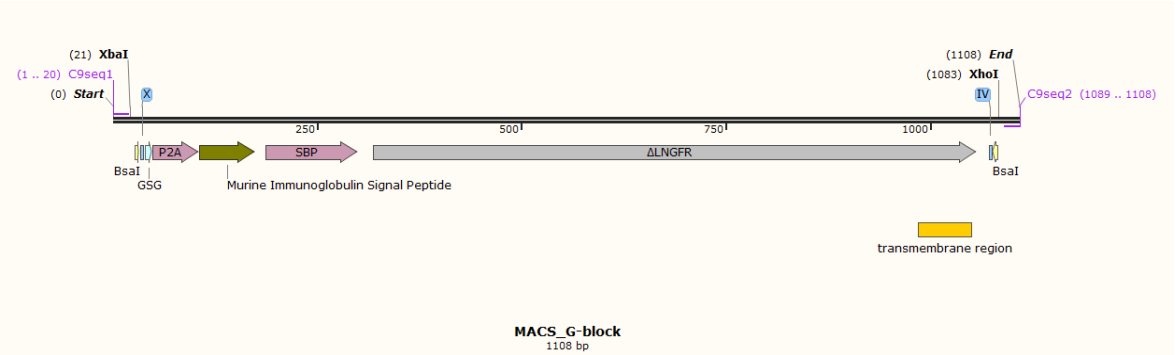
- Nakon PCR reakcija te restrikcijskih digestija DNA odsječaka i plazmida za kloniranje, DNA je pročišćena setom *QIAquick PCR Purification Kit* prema uputama proizvođača.
- Koncentracija i čistoća DNA određene su mjerenjem apsorbancija na 260 nm i 280 nm uređajem NanoVue.

3.2.2 Konstrukcija donor plazmida s modulom MACS_G-block

3.2.2.1 PCR umnažanje odsječka DNA MACS_G-block

Komercijalno sintetizirani odsječak DNA MACS_G-block (Slika 5) nabavljen je u ukupnoj količini od 1 µg. Kako bi ta količina bila dovoljna za dovršetak planiranog eksperimenta, MACS_G-block je umnožen PCR reakcijom prema protokolu *Herculase II Fusion Enzyme with dNTPs Combo* za veličinu kalupa DNA od 1 do 10 kb (kilobaza). Korištene su početnice C9seq1- *forward* i C9seq2- *reverse* (Tablica 1). PCR program je bio: 2 min početna denaturacija pri 95 ºC; 30 ciklusa umnažanja - denaturacija 20 s pri 95 ºC, prianjanje početnica 20 s pri 55 ºC i elongacija 40 s pri 72 ºC; završna elongacija 3 min pri 72 ºC.

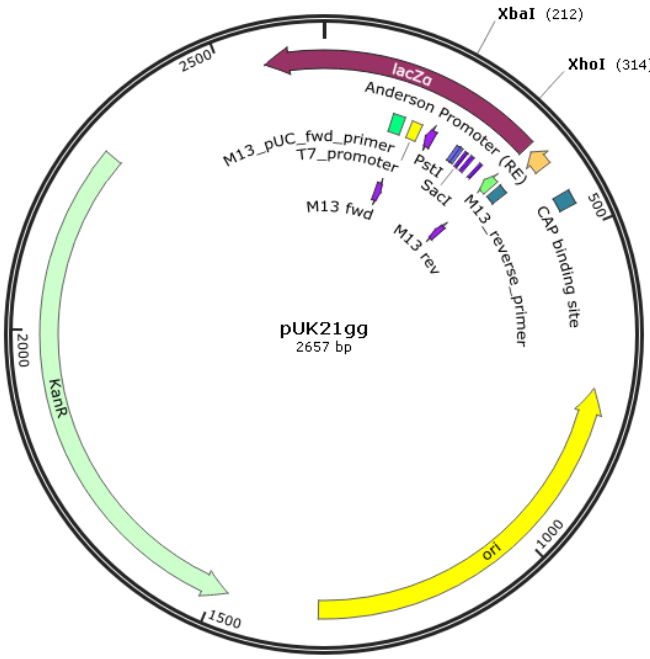
Na 1% gel agaroze naneseno je 3 µL produkta PCR reakcije s 1 µL *Gel Loading Dye Purple 6*× boje i 5 µL *CSL-MDNA-100BPH* molekulskog markera. Nakon vizualizacije vrpce DNA, produkt PCR reakcije je pročišćen i izmjerene su mu koncentracija i čistoća.



Slika 5: Shematski prikaz MACS_G-block u programu *SnapGene*. Veličine od 1108 pb ovaj odsječak DNA ima kodirajuću sekvencu fuzijskog membranskog kompleksa sastavljenog od 38 aminokiselina dugog streptavidin vezujućeg peptida (SBP, od engl. *Streptavidin Binding Peptide*) i N-terminalnog kraja skraćene verzije receptora LNGFR (od engl. *Low Affinity Nerve Growth Receptor*). Dio kodirajuće sekvence ovog modula su i samocijepajući peptid P2A (od engl. *2A self-cleaving peptides*) i mišji imunoglobulinski signalni peptid (od engl. *Murine Immunoglobulin Signal Peptide*). Na ovoj shemi prikazana su i mjesta vezanja početnica C9seq1 i C9seq2 te mjesta cijepanja enzimima *XbaI* i *XhoI* upotrebljenih tijekom ugradnje tog fragmenta u vektor pUK21gg.

3.2.2.2 Ugradnja odsječka DNA MACS_G-block u plazmid pUK21gg

Plazmid pUK21gg bio je vektor za kloniranje odsječka DNA MACS_G-block (Slika 6). Radi se o derivatu vektora pUK21 (Vieira i Messing 1991) skraćenom za 432 pb, iz kojeg su ciljanom mutagenezom uklonjena restrikcijska mjesta za enzime *BsaI*, *Esp3I* i *BbsI*, koji se koriste u *Golden Gate* kloniranju.



Slika 6: Shematski prikaz plazmidnog vektora pUK21gg. Značajke ovog plazmida su: α podjedinica β-galaktozidaze, ishodište replikacije specifično za prokariote te kanamicinska rezistencija. Na slici su prikazana mjesta prepoznavanja enzima *XbaI* i *XhoI* upotrebljena prilikom ugradnje odsječka DNA MACS_G-block.

Odsječak DNA MACS_G-block i plazmid pUK21gg pocijepani su restrikcijskim enzimima *XbaI* i *XhoI*. Restrikcijska smjesa MACS_G-block sadržavala je: 1 µg pročišćenog produkta PCR; 10 U *XbaI*; 10 U *XhoI*; 2 µL 10× Cut Smart pufera; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Restrikcijska smjesa pUK21gg sadržavala je: 500 ng plazmidne DNA; 5 U *XbaI*; 5 U *XhoI*; 2 µL 10× Cut Smart pufera; H_2O do konačnog volumena od 20 µL. Digestija se odvijala u termobloku 60 min pri 37 ºC. Uzorci su pročišćeni, određene su im koncentracija i čistoća te su pohranjeni na temperaturi od -20ºC.

Insert MACS_G-block ligiran je u plazmid pUK21gg u molarnom omjeru 5:1. Ligacijska smjesa je sadržavala: 104.5 ng inserta; 104 ng plazmida; 175 U T4 ligaze; 2 µl 10× T4 DNA ligacijskog pufera; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Neželjena recirkularizacija vektora ispitana je negativnom kontrolom pripremom smjese u koju je umjesto inserta dodana dH_2O do jednakog konačnog volumena. Ligacija se odvijala u uređaju za PCR 30 min pri 16 ºC.

Ligacijska smjesa je transformirana u XL10-Gold stanice metodom temperaturnog šoka. Transformante su nasađene na hranjivu podlogu s kanamicinom i nekoliko bakterijskih kolonija je analizirano metodom *colony* PCR s početnicama pUX21_seqF- *forward* i

pUX21_seqR- *reverse* (Tablica 1). PCR program je bio: 3 min početna denaturacija DNA pri 98 °C; 35 ciklusa umnažanja željenog odsječak DNA - 10 s pri 98 °C, 30 s pri 53 °C, 55 s pri 72 °C; 5 min završna faza sinteze pri 72 °C; pohrana uzoraka na temperaturi od 4 °C. Produkti reakcije vizualizirani su u 1% gelu agaroze i identificirane su pozitivne kolonije. U njima su umnoženi rekombinantni plazmidi i ispravnost ugradnje odsječka DNA MACS_G-block provjerena je sekvenciranjem Sangerovom metodom.

3.2.3 Konstrukcija donor plazmida s modulom mRuby3

Odsječak DNA mRuby3 ligiran je u destinacijski plazmid nizvodno od njegove regije T2A samocijepajućeg oligopeptida. Ostale značajke destinacijskog plazmida bile su mjesta prepoznavanja *Golden Gate* enzima *BsaI*, kanamicinska rezistencija i ishodište replikacije specifično za prokariote. Donor odsječka mRuby3 bio je plazmid s jednakim značajkama ali bez mjesta prepoznavanja enzima *BsaI*.

Restrikcijom su formirani međusobno kompatibilni kohezivni krajevi između mRuby3 odsječka i destinacijskog plazmida. Pripremljene su dvije restrikcijske smjese, jedna s 1.5 µg plazmida donora i druga s 1 µg destinacijskog plazmida te s idućim komponentama: 10 U *NcoI*; 10 U *KasI*; 2 µl 10× CutSmart pufera; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Uzorci su cijepani 16 h pri 37 ºC, a prije posljednjeg sata, u restrikcijske smjese dodano je još 5 U *KasI* enzima za kojeg se sumnjalo da cijepa nešto manjom efikasnosti od enzima *NcoI*.

Produkti restrikcije su analizirani u 1% gelu agaroze. Restrikcijskim smjesama dodano je po 3 µL *10× CoralLoad* boje te je 20 µL tih smjesa naneseno na gel. Na gel je naneseno i 4 µL *100 bp DNA Ladder Ready to Load* molekulskog markera. Vizualizirana je vrpca DNA veličine od 712 pb koja je odgovarala odsječku DNA mRuby3 i vrpca od 2969 pb koja je odgovarala destinacijskom plazmidu. Vrpce su pročišćene setom *QIAquick Gel Extraction kit* i određene su im koncentracija i čistoća.

Destinacijski plazmid je defosforiliran čime je onemogućena njegova spontana recirkularizacija. Reakcija smjesa je sadržavala: 200 ng plazmidne DNA; 1 U temperaturno osjetljive alkalne fosfataze FastAP; 2 µl 10× FastAP pufera; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Defosforilacija se odvijala 15 min pri 37 ºC nakon čega je alkalna fosfataza inaktivirana 5 min pri 75 ºC.

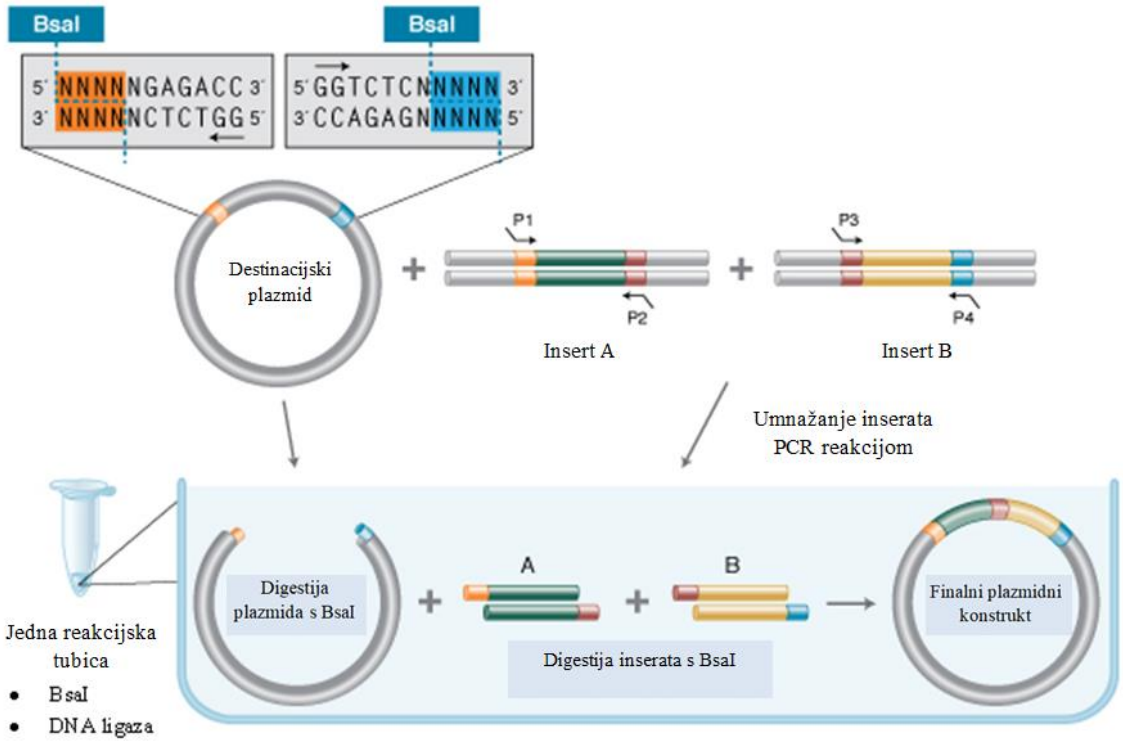
U defosforilirani plazmid ligiran je mRuby3. Ligacijskoj smjesi molarnog omjera 5:1 (insert : vektor) dodano je 175 U T4 ligaze i 2 µl 10× T4 DNA ligacijskog pufera do konačnog volumena od 20 µL. Negativna kontrola bila je smjesa bez inserta. Ligacija se odvijala 30 min pri 16 ºC. Sa 4 µL ligacijske smjese i s 3 µL negativne kontrole, metodom temperaturnog šoka transformirane su XL10-Gold stanice. Transformante su nasađene na podloge s kanamicinom. Rekombinantni plazmidi provjereni su metodom *colony PCR* s početnicama: FP_Ruby_NcoI_Fw- *forward* koja je dijelom komplementarna ugrađenom mRuby3 modulu i dijelom uzvodnoj regiji plazmida i početnicom pUX21-seqR- *reverse* komplemenarnom nizvodnoj plazmidnoj regiji (Tablica 1). PCR program je bio: 3 min pri 98 °C; 35 ciklusa - 10 s pri 98 °C, 30 s pri 53 °C, 55 s pri 72 °C; 5 min pri 72 °C; pohrana uzoraka na 4 °C.

PCR produkti analizirani su u 1% gelu agaroze. Na gel je naneseno 3 µL uzorka i 4 µL *100 bp DNA Ladder Ready to Load* molekulskog markera. Detektirani su pozitivni bakterijski klonovi i rekombinantni plazmidi su provjereni sekvenciranjem Sangerovom metodom.

3.2.4 Konstrukcija finalnog plazmida metodom *Golden Gate* kloniranja

3.2.4.1 Princip rada metode *Golden Gate* kloniranja

Metoda *Golden Gate* kloniranja temelji se na sposobnosti restrikcijskih endonukleaza tipa IIS da cijepaju DNA distalno od mjesta prepoznavanja ostavljajući nepalindromske kohezivne krajeve proizvoljne sekvence, dugačke četiri nukleotida. U ovoj metodi kloniranja željeni fragmenti DNA okružuju se restrikcijskim mjestima i distalnim krajevima koji će dati međusobno kompatibilne stršeće krajeve prema redoslijedu kojim se fragmenti žele povezati u finalni produkt. Kako ligirani konstrukt više neće imati mjesta prepoznavanja enzima IIS, digestija i ligacija mogu se odvijati istovremeno u jednoj reakcijskoj tubici (Slika 7). Unatoč kompleksnosti reakcije, većina novonastalih klonova dobivenih nakon transformacije sadrže željeni konstrukt.



Slika 7: Shematski prikaz metode *Golden Gate* kloniranja. *BsaI* je restrikcijska endonukleaza tipa IIS koja prepoznaje DNA slijed 5′-GGTCTC-3′ te nizvodno cijepa DNA ostavljajući 4 nukleotida duge nepalindromske kohezivne krajeve. Metodom PCR u inserte se ugrađuju mjesta prepoznavanja *BsaI* enzima s distalnim krajevima prema redoslijedu kojim se fragmenti DNA namjeravaju povezani u finalni konstrukt. Ugradnja se radi početnicama koje na 5′ kraju nose sekvence tih fragmenata. Digestija destinacijskog plazmida i inserata s enzimom *BsaI* kao i njihova ligacija u finalni konstrukt odvija se u istoj reakcijskoj tubici jer ligirani konstrukt gubi mjesta prepoznavanja tog enzima. U ovom diplomskom radu mjesta prepoznavanja enzima *BsaI* već su bila dio plazmida iz kojih su izrezivani inserti zbog čega ugradnja tih mjesta nije bila potrebna. Slika je preuzeta i uređena od: https://international.neb.com/

3.2.4.2 Konstrukcija plazmida s koordiniranom policistronskom ekspresijom gena: dCas9-DNMT3A, mRuby3 i MACS_G-block

Metodom *Golden Gate* kloniranja DNA odsječci iz 7 donorskih plazmida izrezani su enzimom *BsaI* i povezani su u okosnicu destinacijskog plazmida koja je sadržavala: slijed za unos plazmida u jezgru DTS (od engl. *DNA nuclear Targeting Sequences*), mjesto za kloniranje, izvorište replikacije u prokariota i gen za ampicilinsku rezistenciju. U mjesto kloniranja destinacijskog plazmida ugrađeni su redom: U6 promotor; mRuby3 gen pod ekspresijskom kontrolom lac promotora; DNMT3A, dCas9, T2A samocijepajući oligopeptid, mRuby3, P2A samocijepajući oligopeptid i MACS_G-block povezani u konstrukt s policistronskom ekspresijskom pod kontrolom pilećeg β-aktinskog promotora i CMV pojačivača (od engl. H*uman Cytomegalovirus Enhancer*); te terminator transkripcije - konstrukt *Assembly 1*. Sastavljen je i konstrukt s jednakim elementima ali s

mutacijom E756A unutar katalitičke domene DNMT3A zbog čega je ona bila inaktivna - konstrukt *Assembly 2*.

Konstrukti su sastavljeni u moralnom omjeru 1:3 (inserti: destinacijski plazmid) u reakcijskoj smjesi s: 10 U *BsaI*; 175 U T4 DNA ligaze; 2 µl 10× Cut Smart pufera; 10 mM ATP; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Program reakcije je bio: 30 ciklusa - restrikcija 5 min pri 37 °C i ligacija 10 min pri 16 °C; inaktivacija enzima 5 min pri 50 °C i 10 min pri 80 °C; pohrana na temperaturi od 4 °C. Zaostali linearni fragmenti DNA uklonjeni su s 10 U RecBCD endonukleaze i 1 µL 10 mM ATP-a. Metodom temperaturnog šoka smjese su transformirane u XL10-Gold stanice i nasađene su na podloge s ampicilinom, IPTG-om i X-Galom. Kolonije crvene boje provjerene su metodom *colony* PCR s početnicama C9seq4- *forward* i tNS-Ter-H-NcoI- *reverse* (Tablica 1) te je u pozitivnim klonovima napravljeno umnažanje plazmida.

3.2.4.3 Restrikcijska analiza plazmida nakon *Golden Gate* kloniranja

U računalnom programu *SnapGene* napravljena je simulacija reakcije restrikcije plazmida s enzimima *XbaI* i *SphI*. Restrikcijske smjese sadržavale su: 500 ng plazmidne DNA; 5 U *XbaI*; 5 U *SphI*; 2 µl 10× Cut Smart pufera; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Program je bio: restrikcijska digestija 8 h pri 37 °C; inaktivacija restrikcijskih enzima 20 min pri 65 °C; skladištenje na temperaturi od 4 °C. Produkti su vizualizirani u 1% gelu agaroze i detektirani su pozitivno sastavljeni plazmidi.

3.2.4.4 Sastavljanje i ugradnja sekvence gRNA u finalne plazmide s koordiniranom policistronskom ekspresijom gena

Iz pozitivno sastavljenih plazmida restrikcijskim enzimom *BpiI* izrezani su mRuby3 gen i pridružen mu lac promotor. Umjesto njih je ugrađena DNA sekvenca gRNA molekule (tablica 1) za navođenje kompleksa dCas9-DNMT3A na promotor gena *BACH2*. Sekvenca je formirana sparivanjem jednolančanih *sense* i *antisense* lanaca u dvolančane oligonukleotide s kohezivnim krajevima koji su bili kompatibilni krajevima pocijepanog plazmida a enzimom *BpiI*. Sadržaj reakcije bio je: 1 µL *sense* i 1 µL *antisense* jednolančanih oligonukleotida (100 µM); 5 U T4 polinukleotid kinaze; 1 µL 10× T4 DNA ligacijski pufer; dH_2O do konačnog volumena od 10 µL. Program je bio: fosforilacija 30 min pri 37 ºC; denaturacija 5 min pri 95 ºC; sastavljanje dvolančanih oligonukleotida postepenim snižavanjem temperature 5 ºC po min do konačnih 25 ºC.

Sekvenca gRNA ugrađena je u finalne plazmide u molarnom omjeru 5:1 (insert: plazmid). Sastav smjese bio je: 100 ng plazmidne DNA; 0.95 ng sparenih oligonukleotida; 5 U *BpiI*; 175 U T4 DNA ligaze; 2 µL 10× pufer G; 1 µL 10mM DTT; 1 µL 10 mM ATP; dH_2O do konačnog volumena od 20 µL. Program reakcije bio je: 6 ciklusa - 5 min pri 37 ºC i 5 min pri 23 ºC; pohrana na temperaturi od 4 ºC.

Konstrukti su transformirani u XL10-Gold stanice i transformante su nasađene na podloge s ampicilinom i IPTG-om. Finalni konstrukti provjereni su metodom *colony* PCR s početnicama pUX21-seqF- *forward* i F3f-sgRNA(dual)_A- *reverse* (Tablica 1). PCR program je bio: 3 min pri 98 °C; 30 ciklusa - 10 s pri 98 °C, 20 s pri 49 °C, 25 s pri 72 °C; 3 min pri 72 °C; pohrana uzoraka na temperaturi od 4 °C. Pozitivni konstrukti provjereni su sekvenciranjem Sangerovom metodom.

Tablica 1: Oligonukleotidni sljedovi početnica korišteni prilikom konstrukcije plazmidnih vektora te slijed gRNA molekule klonirane u finalne konstrukte *Assembly 1* i *2*.

Naziv	Sekvenca (5'→3')
C9seq1	TGAACCCCGACAACAGCGAC
C9seq2	ATCCTGACCTTCCGCATCCC
pUX21_seqF	GTAAAACGACGGCCAGT
pUX21_seqR	AGCGGATAACAATTTCACACAGG
FP_Ruby_NcoI_Fw	GAGAGAGCCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGA
pUX21-seqR	AGCGGATAACAATTTCACACAGG
C9-seq4	GAAGTCCAAGCTGGTGTCCG
tNS-Ter-H-NcoI	TTACTCCATGGTCTCAACCTCATGCCTGCTATTCTCTTCCCAATCCTC
pUX21-seqF	GTAAAACGACGGCCAGT
F3f-sgRNA(dual)A	AAACTTCCCGTTCCTAGAAAATGC
gRNA	CACCGCATTTTCTAGGAACGGGAA

3.2.5 Održavanje stanica FreeStyle 293-F u kulturi

Alikvot suspenzijskih stanica FreeStyle 293-F u volumenu od 1 mL i gustoći 1×10^7 st/mL nalazio se u otopini od 90% FreeStyle 293 hranjivog medija i 10%

krioprotektanta DMSO. Izvađen iz tekućeg dušika te kratko odleđen, alikvot je dodan u 29 mL hranjivog medija zagrijanog na temperaturu od 37 °C. Stanična kultura održavana je u sterilnom Erlenmeyer flasku pri uvjetima: 37 °C, 8% CO_2 i stalne agitacije od 135 rpm. Pasaže su se radile svaki treći dan u volumenu od 30 mL i gustoći od 200000 st/mL. Minimalna vijabilnost stanica za njihovo daljnje održavanje bila je 90%.

3.2.6 Transfekcija stanica FreeStyle 293-F

Prema uputama proizvođača, prije postupka transfekcije, stanice FreeStyle 293-F morale su dosegnuti gustoću od oko 1×10^6 st/mL s vijabilnosti iznad 90% u staničnoj kulturi. Na dan transfekcije iz alikvota 30 mL stanične kulture uređajem za automatsko brojanje stanica EVE izmjerene su zadovoljavajuće vrijednosti. Transfekcija je napravljena prema protokolu Invitrogen s konstruktom *Assembly 2*. Odlučeno je da će transfekcija i s konstruktom *Assembly 1* biti napravljena nakon što potvrdimo efikasnost same metode s razlogom štednje potrošnog materijala.

Po jednoj transfekcijskoj reakciji razrijeđen je 1 µg plazmidne DNA u Opti-MeM I mediju u konačnom volumenu od 80 µL, te 2 µL transfekcijskog reagensa 293Fectin u jednakom mediju i konačnom volumenu. Otopine su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Otopina s plazmidnom DNA premještena je na vorteks i dokapavanjem joj je dodana otopina s 293Fectin reagensom, slijedila je inkubacija 20 min na sobnoj temperaturi. Na dvije ploče sa 6 bunara nasađeno je 1×10^6 FreeStyle 293-F stanica u volumenu od 1840 µL. Na 6 uzoraka nakapano je po 160 µL transfekcijske smjese, a na preostalih 6 nakapan je jednak volumen Opti-MeM I medija (MOCK kontrola). Uzorci su premješteni u inkubator s uvjetima: 37 °C, 8% CO_2 i stalne agitacije od 135 rpm.

Efikasnost transfekcije određena je 24 h nakon postupka detekcijom crvenih fluorescentnih signala mRuby3 proteina u uspješno transfeciranim stanicama. Detekcija je napravljena na invertnom mikroskopu Olympus IX73.

3.2.7 Detekcija SBP-ΔLNGFR na membranama transfeciranih stanica FreeStyle 293-F metodom imunofluorescencije

Metodom imunofluorescencije provjerena je prisutnost rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR na membranama stanica FreeStyle 293-F; 24, 48 i 72 h nakon postupka transfekcije. Na dan analize stanicama je određena gustoća i vijabilnost. Ukupan sadržaj staničnih kultura prebačen je u epice i centrifugiran 5 min na 100 g, supernatant je odstranjen i talog stanica je resuspendiran u 1 mL PBS-a. Postupak je ponovljen još jedan put. 1 mL staničnih suspenzija razrijeđen je 5 do 10 puta te je na predmetna stakla nakapano 30 µL. Svrha razrjeđivanja bila je dobiti pojedinačne stanice nakon nakapavanja na predmetno staklo. Stakla su posušena u sušioniku i uzorci su fiksirani 15 min u paraformaldehidu. Fiksacijsko sredstvo odstranjeno je ispiranjem tri puta s 200 µL PBS-a. Glicerolom je označeno mjesto s fiksiranim stanicama.

Protein SBP-ΔLNGFR vizualiziran je FITC-om (od engl. *Fluorescein Isothiocyanate*) obilježenim antitijelima *anti-human CD271* s afinitetom vezanja za LNGFR. Antitijela su razrijeđena u PBS-u 20 puta i na uzorke je nakapano 100 µL. Nakon 24 h antitijela su odstranjena ispiranjem uzoraka 3 puta u PBS-u. Pripremljena je otopina od DAPI fluorescentne boje i medija *Dako Fluorescent Mounting* u omjeru 1:2000 te je na uzorke nakapano 20 µL te otopine. Slijedila je analizira na invertnom mikroskopu Olympus IX73.

Pozitivna kontrola metode imunofluorescencije napravljena je prema jednakom protokolu na staničnoj liniji ljudskog osteosarkoma U2OS vizualizacijom prirodno prisutnog receptora neuralnog faktora rasta NGFR (od engl. *Nerve Growth Factor Receptor*).

3.2.8 Magnetski aktivirano sortiranje populacije stanica FreeStyle 293-F nakon postupka transfekcije

Magnetski aktivirano sortiranje stanica napravljeno je prema uputama proizvođača *Miltenyi Biotec* za 10^7 stanica po uzorku u periodu od 24, 48 i 72 h nakon transfekcije. Na dan postupka, suspenzije stanica FreeStyle 293-F centrifugirane su 5 min na 300 g. Supernatant je odstranjen i talog stanica je resuspendiran u 1 mL labeling pufera nakon čega je ponovljen jednak postupak centrifugiranja. Stanični pelet je resuspendiran u 90 µL labeling pufera, dodano mu je 10 µL streptavidin vezujućih paramagnetičnih kuglica nanometarske veličine i slijedila je inkubacija 15 min na 4 °C. Paramagnetične kuglice imale su afinitet vezanja

peptida SBP kao sastavnog djela rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR. Uzorci su isprani s 1 mL labeling pufera, centrifugirani 5 min na 300 g i supernatant je odstranjen. Stanični talog je resuspendiran u 500 µL separacijskog pufera.

Kolona za separaciju premještena je u područje jakog magnetskog polja na MACS separator i isprana je s 500 µL separacijskog pufera. Stanična suspenzija je nakapana i propuštena kroz kolonu te je kolona isprana tri puta s 500 µL separacijskog pufera. Kolona je skinuta s magnetskog separatora, premještena iznad kolekcijske tubice i ispiranjem s 1 mL separacijskog pufera. U kolekcijsku tubicu sakupljen je ukupan sadržaj stanica koje su bile vezane na separacijskoj koloni. Sortiranim stanicama određena je gustoća i vijabilnost. Pozitivno sortirane stanice centrifugiraju se 5 min i separacijski pufer se zamjenjuje hranjivim medijem.

4 REZULTATI

4.1 Pregled konstruiranih donor plazmida

Pripremljena su dva donorska plazmida. Jedan s DNA odsječkom MACS_G-block koji je kodirao za SBP-ΔLNGFR, a drugi s odsječkom reporter gena mRuby3. Ti su odsječci kasnije ugrađeni u finalne konstrukte za transfekciju stanica - *Assembly 1* i *2*.

4.1.1 Donor plazmid s modulom MACS_G-block

Prije ugradnje DNA odsječka MACS_G-block u okosnicu plazmida pUK21gg, napravljeno je njegovo umnažanje metodom PCR. Pozitivan rezultat reakcije zabilježen je elektroforezom u gelu agaroze vizualizacijom DNA vrpci veličine 1062 pb.

Bakterije XL10-Gold transformirane ligacijskom smjesom odsječka MACS_G-block i plazmida pUK21gg na hranjivoj podlozi s kanamicinom formirale su 20-ak kolonija. S obzirom na to da za vrijeme ligacije može doći i do nespecifične ugradnje DNA odsječka kao i recirkularizacije plazmida u kojeg se vrši ugradnja, napravljena je analiza metodom *colony* PCR. S hranjive podloge odabrano je 13 bakterijskih kolonija za tu analizu. Pozitivni rezultati zabilježeni su u 11 uzoraka u gelu agaroze, vizualizacijom vrpci DNA veličine 1196 pb. Plazmidna DNA iz dviju pozitivnih kolonija umnožena je u prekonoćnim kulturama XL10-Gold stanica te je provjerena sekvenciranjem Sangerovom metodom. Jedan replika rekombinantnog plazmida imala je točkastu mutaciju unutar modula MACS_G-block na poziciji Glu53 gdje je kodon „GAA“ promijenjen u stop kodon „TAA“. Druga replika bila je ispravna te je upotrebljena u daljnjem eksperimentalnom postupku.

4.1.2 Donor plazmid s modulom mRuby3

Bakterijske stanice XL10-Gold transformirane ligacijskom smjesom modula mRuby3 s destinacijskim plazmidom, na hranjivoj podlozi s kanamicinom formirale su 7 bakterijskih kolonija. Sve kolonije su analizirane metodom *colony* PCR. U gelu agaroze vizualizirane su vrpce DNA veličine 1334 pb čime su u svim klonovima potvrđeni pozitivni rekombinantni plazmidi. Dvije replike rekombinantnih plazmida sekvencirane su Sangerovom metodom i u njima je finalno potvrđena ispravna ugradnja modula mRuby3.

4.2 Konstrukcija finalnih plazmida za transfekciju stanica FreeStyle 293-F

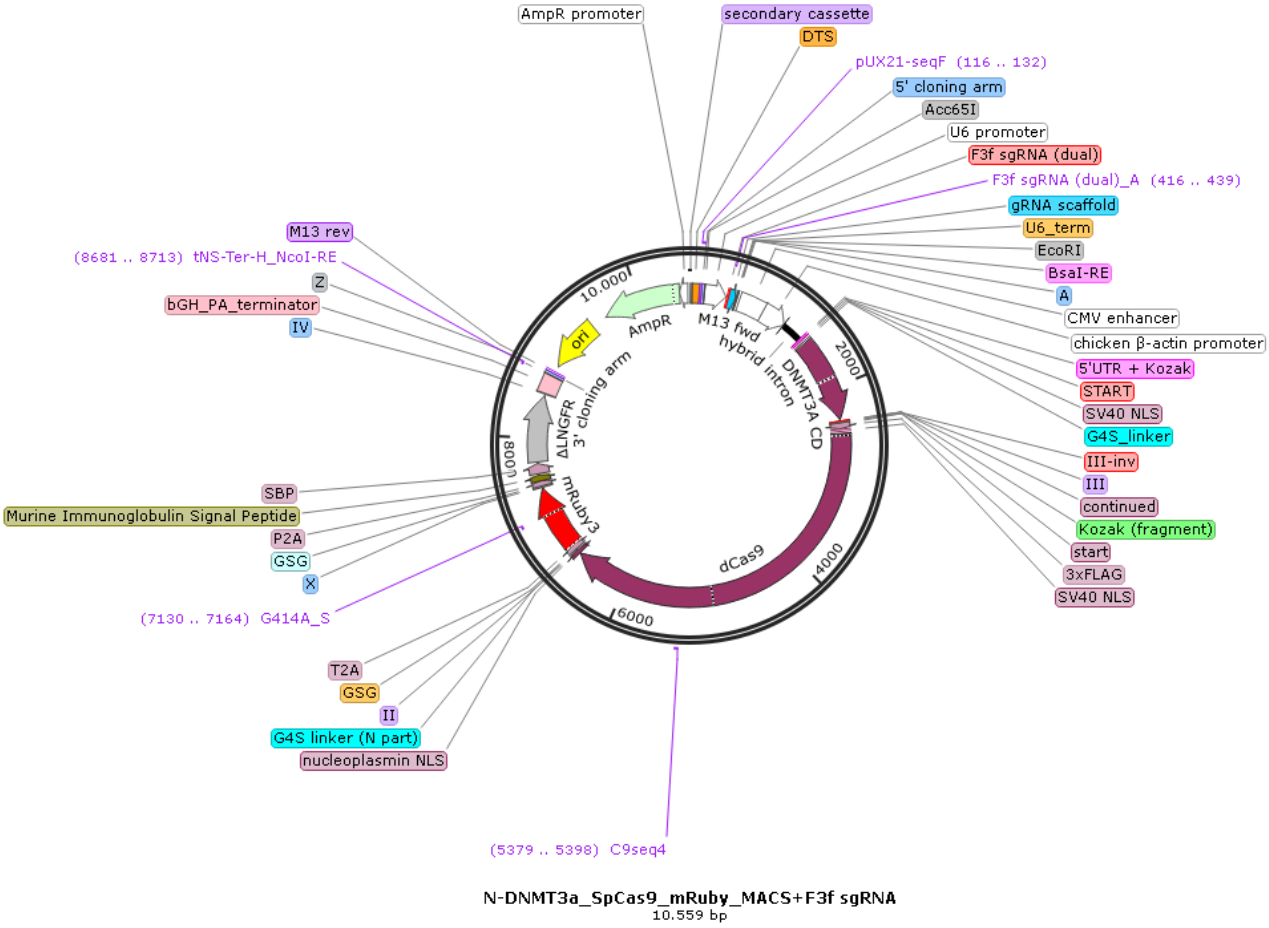
Metodom *Golden Gate* kloniranja pripremljeni su plazmidi s koordiniranom policistronskom koekspresijom gena: dCas9-DNMT3A, mRuby3 i SBP-ΔLNGFR pod kontrolom pilećeg β-aktinskog promotora i CMV pojačivača. Jedan plazmid kodirao je za dCas9-DNMT3A s aktivnom katalitičkom domenom DNMT3A – konstrukt *Assembly 1*, dok je drugi kodirao za inaktivan oblik iste domene - konstrukt *Assembly 2*. Koordinira koekspresija postignuta je povezivanjem dCas9-DNMT3A i mRuby3 sa samocijepajućim oligopeptidom T2A te povezivanjem mRuby3 i SBP-ΔLNGFR sa samocijepajućim oligopeptidom P2A. Uzvodno od tih modula, pod kontrolom lac promotora kloniran je reporter gen uspješnog postupka *Golden Gate* kloniranja mRuby3. Naposljetku, u finalnim konstruktima on je zamijenjen s DNA odsječkom gRNA molekule pod transkripcijskom kontrolom U6 promotora. U transfeciranim stanicama gRNA je navodila kompleks za ciljanu metilaciju genoma - dCas9-DNMT3A na promotor gena *BACH2* (Slika 8) (promjena metilacijskog statusa tog područja nije praćena u ovom radu).

Golden Gate reakcija pripremljena je povezivanjem fragmenata iz 7 donorskih vektora u okosnicu recipijentnog plazmida koji je imao izvorište replikacije prokariota pUC, sekvencu za unos plazmida u jezgru DTS (od engl. *DNA nuclear Targeting Sequences*) i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin.

Bakterijske stanice XL10-Gold transformirane su reakcijskim smjesama *Golden Gate* kloniranja te su na pločama od krutog LB medija s ampicilinom, IPTG-om i X-Gal-om formirale stotinjak bakterijskih kolonija; plavih, bijelih i crvenih. Plava boja kolonija ukazivala je na negativan rezultat reakcije *Golden Gate* kloniranja. Kako su značajke 6 od 7 donorskih plazmida bile: kodirajuća sekvenca α podjedinice β-galaktozidaze (lacZ-α modul) s uzvodno smještenim lac operatorom, IPTG iz hranjive podloge nakon ulaska u transformirane bakterijske stanice vezao je represor lac operatora zbog čega je nesmetano vršena sinteza α podjedinice β-galaktozidaze. Bakterijske stanice XL10-Gold kodirale su za drugu podjedinicu β-galaktozidaze (podjedinica Ω), što je omogućilo sastavljanje funkcionalnog oblika tog enzima u transformiranim stanicama. β-galaktozidaza hidrolizirala je X-Gal iz podloge u 5-bromo-4-kloro-indoxyl, spoj s tendencijom spontane dimerizacije u pigment plave boje. Tako je plava boja kolonija ukazivala na to da su transformante zadržale svojstvo ekspresije lacZ-α modula, čija prisutnost nije očekivana u ispravno formiranim finalnim konstruktima. Bijela boja kolonija ukazivala je na to da iako transformante nisu eksprimirale

lacZ-α modul, nisu eksprimirale niti mRuby3 reporter gena čija se ugradnja i ekspresija očekivala nakon uspješnog postupka *Golden Gate* kloniranja. Crvena boja kolonija ukazivala je na pozitivnu reakciju kloniranja. Naime, pod kontrolom lac promotora, mRuby3 bio je prvi kodirajući segment *Assembly 1* i *2* prije ugradnje gRNA molekule. Iako je mRuby3 fluorescentni protein, zbog svojeg jakog intenziteta, nakupljanjem u transformantama obojio je njihove kolonije u golim okom vidljivu crvenu boju.

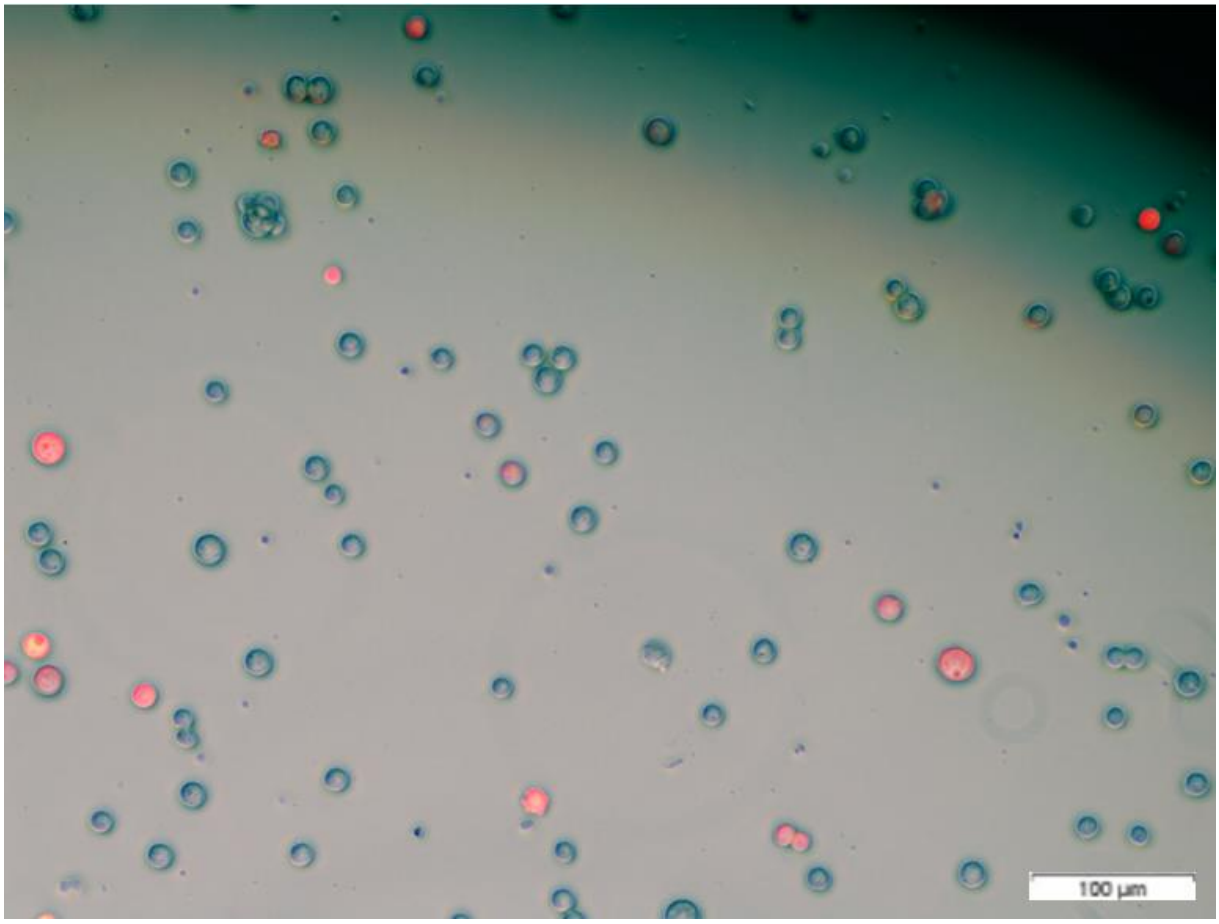
Metodom *colony* PCR potvrđeni su pozitivno sastavljeni konstrukti *Assembly 1* i *2* u 19 od 20 analiziranih crvenih kolonija. Pozitivan rezultat detektiran je vizualizacijom vrpci DNA veličine 3315 pb u gelu agaroze. Analiza metodom restrikcije napravljena je na tri pozitivna uzorka *Assembly 1* i tri *Assembly 2*. Vrpce DNA veličina od: 4411 pb, 2941 pb, 1888 pb, 1555 pb i 817 pb prethodno predviđene simulacijom reakcije restrikcije s enzimima *XbaI* i *SphI* u programu *SnapGene* vizualizirane su u gelu agaroze u 5 od 6 uzoraka. Ugradnja gRNA molekule napravljena je u jedan pozitivan uzorak *Assembly 1* i *2*. Sekvenciranjem Sangerovom metodom potvrđena je ispravnost formiranih konstrukata.



Slika 8: Shematski prikaz finalnog plazmidnog konstrukta s policistronskom ekspresijom gena - *Assembly 1*. U uokvirenim prozorima označeni su moduli od kojih je plazmid izgrađen, a ljubičastom bojom bez okvira označena su mjesta vezanja početnica koje su upotrebljene tijekom eksperimentalnog postupka. Plazmid *Assembly 2* razlikuje se od prikazanog plazmida *Assembly 1* samo po točkastoj mutaciji E756A zbog koje je katalitička domena njegovog DNMT3A inaktivirana.

4.3 Detekcija transfeciranih stanica FreeStyle 293-F

Prema protokolu *Invitrogen* napravljena je transfekcija stanica FreeStyle 293-F s konstruktom *Assembly 2*. Udio transfeciranih stanica određen je 24 h nakon postupka, vizualizacijom crvenih signala reporter proteina mRuby3 unutar četiri vidna polja na invertnom mikroskopu (Slika 9). Udio transfeciranih stanica bio je 14.5%.



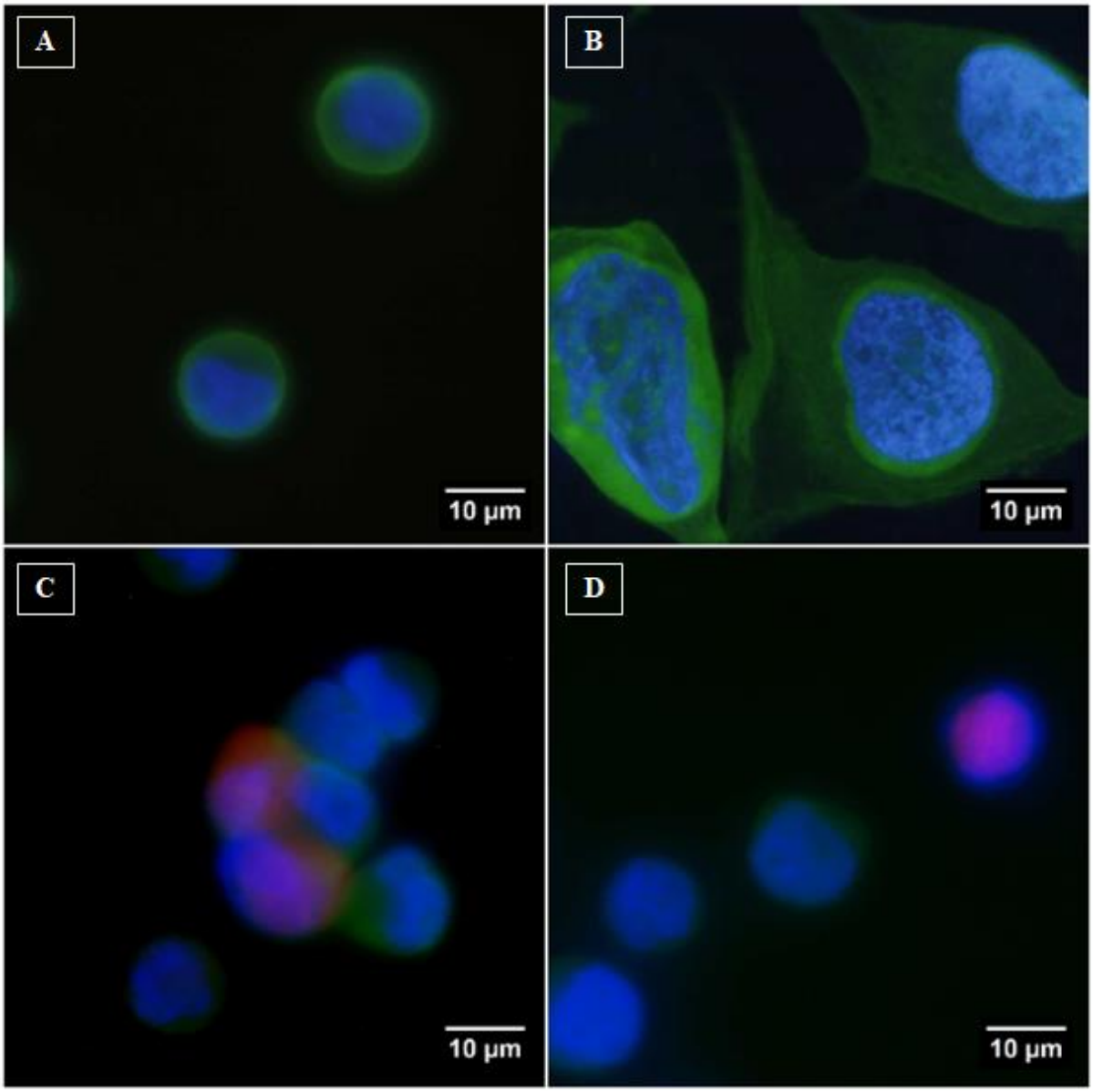
Slika 9: Primjer vidnog polja prema kojemu je određen postotak transfekcije stanica FreeStyle 293-F s konstruktom *Assembly 2*. Heterogena stanična populacija formirana je nakon postupka transfekcije jer sve stanice nisu uspješno primile plazmidni konstrukt *Assembly 2*. Crveni signali odgovaraju eksprimiranom mRuby3 reporter proteinu u citoplazmama transfeciranih stanica. Slika je dobivena preklapanjem fotografija u programu *ImageJ* uslikanih na svjetlom i fluorescentnom vidnom polju.

4.4 Detekcija rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR u membranama stanicama FreeStyle 293-F metodom imunofluorescencije

Metodom imunofluorescencije provjerena je prisutnost rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR na membranama transfeciranih stanica 24, 48 i 72 h iza postupka transfekcije. Vizualizacija SBP-ΔLNGFR napravljena je FITC-om obilježenim antitijelima s afinitetom vezanja podjedinice LNGFR, a kromatinska DNA u stanicama vizualizirana je fluorescentnom bojom DAPI.

Pozitivan rezultat zabilježen je nakon 24 h u transfeciranim stanicama vizualizacijom zelenih signala na staničnim membranama. S druge strane, takvi signali izostali su 48 i 72 h nakon postupka transfekcije (Slika 10). U tim uzorcima zabilježeni su samo autofluorescirajući zeleni signali. Da se nije radilo o vjerodostojnim signalima dokazno je

time što mnoge stanice s takvim signalima u svojim citoplazmama nisu imale eksprimiran mRuby3 reporter gen pozitivne transfekcije. Također, u nekim transfeciranim stanicama s eksprimiranim mRuby3 reporter genom nisu opaženi takvi zeleni signali. Pozitivna kontrola metode imunofluorescencije napravljena je jednakim antitijelom na staničnoj liniji ljudskog osteosarkoma U2OS. Vizualiziran je receptor neuralnog faktora rasta NGFR smješten unutar jezgrine membrani i endoplazmatske mrežice. Detekcijom reporter proteina mRuby3 i membranskog kompleksa SBP-ΔLNGFR ujedno je potvrđena sposobnost P2A samocijepajućeg oligopeptida da pridonese funkcionalnoj ekspresiji gena s plazmida za koordiniranu policistronsku koekspresiju.



Slika 10: Vizualizacija rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR metodom imunofluorescencije u stanicama FreeStyle 293-F transfeciranim s plazmidom *Assembly 2*. Antitijelima obilježenim s FITC-om vizualiziran je LNGFR dio proteina SBP-ΔLNGFR na membranama transfeciranih stanicama (zeleni fluorescentni signali), a kromatin u staničnim jezgrama vizualiziran je bojom DAPI (plavi fluorescentni signali). A.) 24 h nakon transfekcije, na membranama transfeciranih stanica detektirani su zeleni signali koji odgovaraju proteinu SBP-ΔLNGFR. B.) Pozitivna kontrola imunofluorescencije - vizualizacija NGFR unutar jezgrine membrane i endoplazmatske mrežice u staničnoj liniji USO2. C.) i D.) 48 i 72 h nakon transfekcije SBP-ΔLNGFR nije detektiran na membranama stanica. U slučaju tih uzoraka na slici su prikazani i crveni signali koji odgovaraju eksprimiranom mRuby3 reporter genu uspješne transfekcije. Kako su blago zeleni signali zabilježeni u stanicama u kojima ujedno nije zabilježena i pozitivna transfekcija, zaključeno je da se radi o autofluorescirajućim zelenim signalima. Fotografije su uslikane na invertnom mikroskopu i preklopljene u programu *ImageJ*.

4.5 Magnetski aktivirano sortiranje transfeciranih stanica FreeStyle 293-F

Ključan dio ovog istraživanja bio je metodom MACS izdvojiti transfecirane stanice FreeStyle 293-F iz heterogenih staničnih populacija formiranih nakon postupka transfekcije (Slika 9). Stanice su sortirane redovnim protokolom *Miltenyi Biotec* za 10^7 stanica po uzorku.

Stanice su sakupljene 24, 48 i 72 h nakon transfekcije. Dodane su im paramagnetične kuglice nanometarske veličine sa streptavidinom koji je imao visok afinitet vezanja djela SPB na proteinu SBP-ΔLNGFR. Vezanje se odvijalo 15 min na 4 °C. Uzorci su naneseni na separacijsku kolonu na MACS separatoru. Stanice označene sa svega nekoliko nanometarskih kuglica trebale su ostati imobilizirane na koloni, dok su neoznačene stanice ispiranjem sa separacijskim puferom trebale napustiti kolonu. Unatoč tome sakupljanjem frakcije imobiliziranih – kuglicama obilježenih stanica nije zabilježena izolacija transfeciranih stanica FreeStyle 293-F niti nakon jednog od tri ispitana vremenska perioda, točnije nije zabilježena izolacija niti jednog staničnog tipa.

Kako se redovan protokol *Miltenyi Biotec* pokazao neuspješnim, idući cilj bio je optimizirati isti protokol ispitivanjem novih uvjeta separacije. Tako je ishod separacije stanica ispitan još tri puta promjenom idući uvjeta: dodavanjem 0.5% BSA (od engl. *Bovine albumin serum*) bez biotina u labeling pufer, elucijom stanica u zadnjem koraku s hranjivim medijem FreeStyle 293 umjesto sa separacijskim puferom te produživanjem vremena vezanja paramagnetičnih kuglica s predloženih 15 min na 25 min. Niti jedan od ispitanih uvjeta nije rezultiralo separacijom stanica.

5 RASPRAVA

U ovom radu pokušano je sortirati transfeciranu populaciju stanica FreeStyle 293-F metodom magnetski aktiviranog sortiranja - MACS. Postupkom transfekcije plazmidnu DNA primilo je 14.5% stanica u kulturi, stoga je cilj bio odvojiti takve stanice od ostatka stanične populacije. Za izdvajanje transfeciranih stanica odabran je fuzijski protein sastavljen od 38 aminokiselina dugog peptida SBP kovalentno vezanog na skraćenu verziju receptora LNGFR. Nakon njegove ekspresije, LNGFR lokalizira na staničnim membranama i usmjerava SBP u izvanstaničan prostor gdje mu je zadaća bila čvrsto vezati streptavidin na paramagnetičnim kuglicama za separaciju.

Plazmidi kojima su transfecirane stanice nisu imali mehanizam za ugradnju u stanični genom zbog čega je njihova prisutnost kao i ekspresija njihovih gena u stanicama bila prolazna. Iz tog razloga, prije sortiranja stanica zanimalo nas je u kojem vremenskom periodu nakon transfekcije dolazi do ekspresije i lokalizacije rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR u staničnim membranama transfeciranih stanica. Metodom imunofluorescencije pokazano je da 24 sata nakon postupka, SBP-ΔLNGFR lokalizira na staničnim membranama, dok njegova prisutnost nije dokazana nakon 48 i 72 sata. Takav rezultat može se objasniti prirodnim mehanizmom diobe eukariotskih stanica koji u stanice kćeri vrše pravilnu raspodjelu samo kromosomske DNA dok preostala DNA kao što je plazmidna, biva uklonjena citoplazmatskim endonukleazama. Sukladno tome nakon nekoliko staničnih diobi plazmidna DNA iščezava kao i produkti ekspresije njezinih gena. Kako je prosječan poluživot mRNA u stanicama ljudi 9 sati, a proteina 46 sati (Schwanhäusser i sur. 2011) s gubitkom plazmida ubrzo se gubi i svaki njegov utjecaj na stanice. U slučaju ovog eksperimenta, sudeći po lokalizaciji SBP-ΔLNGFR na membranama stanica može se pretpostaviti da je u transfeciranim stanicama FreeStyle 293-F s učestalošću diobe svakih 20 do 25 sati, glavnina plazmida izgubljena već pri prvim diobama.

Prema rezultatima metode imunofluorescencije očekivali smo da će od ispitana tri vremenska perioda, 24 sata nakon transfekcije, stanice biti najpogodnije za sortiranje metodom MACS. Unatoč tome, redovan protokol *Miltenyi Biotec* nije rezultirao pozitivnom separacijom stanica 24, 48 i 72 sata poslije transfekcije zbog čega smo odlučili isprobati nekoliko promijenjenih uvjeta tog protokola. Prvo je ispitan postupak u kojem su stanice s kolone eluirane u ekspresijskom mediju umjesto u separacijskom puferu. Time je izbjegnut

posljednji korak centrifugiranja izoliranih stanica i zamjene separacijskog pufera s ekspresijskim medijem što je potencijalno predstavljalo dodatan stres za stanice nakon sortiranja. Potom je prema sugestijama proizvođača pripremljen labeling pufer sa BSA koji nije sadržavao biotin te je ponovljen jednak postupak sortiranja. Uloga BSA bila je blokirati nespecifična mjesta vezanja na stanicama i tako povećati specifičnost vezanja između streptavidina na kuglicama i SBP peptida. Posljednje je ispitana efikasnost sortiranja stanica produživanjem vremena vezanja paramagnetičnih kuglica s preporučenih 15 na 25 minuta, no kao i u prva dva slučaja pozitivan rezultat je izostao. Tako niti redovan niti izmijenjen protokol *Miltenyi Biotec* nije rezultirao pozitivnom separacijom stanica 24, 48 i 72 sata poslije transfekcije.

Na temelju provedenog istraživanja nije moguće odrediti zašto je magnetski aktivirano sortiranje transfeciranih stanica FreeStyle 293-F bilo neuspješno. Premda je na membranama transfeciranih stanica 24 sata nakon transfekcije metodom imunofluorescencije dokazana prisutnost rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR, postavlja se pitanje je li prije sortiranja stanica streptavidin s paramagnetičnih nanokuglica efikasno vezao SBP na membranama istih stanica. Predlažemo da se efikasnost vezanja nanokuglica provjeri elektronskom mikroskopijom na uzorcima sakupljenim 24 sata nakon transfekcije. U slučaju pozitivnog rezultata podupiremo daljnji rad na optimizaciji istog protokola. Poželjno bi bilo ispitati efikasnost sortiranja nakon označavanja stanica s većim brojem kuglica za separaciju. Kako se u brošurama proizvođača *Miltenyi Biotec* radi očuvanja staničnog integriteta favorizira minimalno označavanje stanica, poželjno bi bilo ispitati je li preporučena količina kuglica uistinu dovoljna za označavanje i efikasno zaustavljanje transfeciranih stanica FreeStyle 293-F na separacijskoj koloni. Nakon označavanja stanica s većom količinom kuglica trebalo bi koristiti labeling pufer s dodanim BSA bez biotina kao u jednom od prethodnih pokušaja optimizacije sortiranja stanica. Time bi se umanjila mogućnost nespecifičnog vezanja zbog povećanog broja kuglica. Smatramo da bi i preciznije definiranje perioda tijekom kojeg SBP-ΔLNGFR lokalizira na membranama transfeciranih stanica također moglo pridonijeti pozitivnom ishodu sortiranja. Zato predlažemo ponoviti postupak imunofluorescencije svakih 8-12 sati unutar vremenskog razdoblja koje daje pozitivne rezultate, te sukladno rezultatu prilagoditi vremenski period od postupka transfekcije do sortiranja. Također, u literaturi je pronađena primjena alternativnog protokola za sortiranje stanica metodom MACS temeljem rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR koji je dao pozitivan rezultat u slučaju sortiranja genetički promijenjenih CD4+ T stanica (Matheson i

sur. 2014, Naamati i sur. 2019). Radi se o protokolu proizvođača *Invitrogen* koji zahtjeva upotrebu paramagnetičkim kuglicama *Dynabeads Biotin Binder* mikrometarske veličine. Protokol tog proizvođača također predlažemo kao potencijalan pristup u postizanju uspješne separacije transfeciranih stanica FreeStyle 293-F metodom MACS.

Prema mnogim literaturnim navodima metoda MACS iznimno je efikasna u izolaciji genetički promijenjenih stanica (Han i sur. 2011, Matheson i sur. 2014, Wei 2001). U usporedbi s jednako često upotrebljenom metodom sortiranja stanica - metodom FACS, prednosti metode MACS su jednostavnije rukovanje te niža cijena i opseg opreme. Stoga prema navedenim sugestijama podupiremo daljnji rad na optimizaciji te metode u slučaju sortiranja transfecirane populacije stanica FreeStyle 293-F.

U ovom diplomskom radu klasičnom metodom kloniranja uspješno su konstruirana dva plazmidna konstrukta, jedan s modulom SBP-ΔLNGFR, a drugi s modulom mRuby3. Oni su zajedno s modulima dCas9-DNMT3A i odgovarajućom gRNA, metodom *Golden Gate* kloniranja sastavljeni u finalne plazmidne vektore s policistronskom ekspresijom gena. Njima su transfecirane stanice FreeStyle 293-F te je nakon 24 sata u 14.5% stanica potvrđena efikasna transfekcija. Potom je od ispitana tri vremenska perioda: 24, 48 i 72 sata nakon transfekcije zabilježeno da fuzijski membranski protein SBP-ΔLNGFR, temeljem kojeg je napravljeno sortiranje stanica metodom MACS, lokalizira na staničnim membranama samo 24 sata nakon transfekcije. Unatoč tome, prema protokolu *Miltenyi Biotec*, stanice su sortirane nakon sva tri vremenska perioda od postupka transfekcije. Kako je pozitivan rezultat izostao, pokušali smo variranjem nekoliko uvjeta separacije optimizirati isti protokol, no također bez pozitivnog ishoda. Zato prema datim sugestijama predlažemo daljnji rad na optimizaciji istog protokola kao i primjenu alternativnog protokola proizvođača *Invitrogen* s kuglicama *Dynabeads Biotin Binder* mikrometarske veličine.

6 ZAKLJUČAK

- Uspješno je konstruiran donor plazmid s modulom MACS_G-block koji je nosio sekvencu rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR.
- Uspješno je konstruiran donor plazmid s modulom mRuby3.
- Uspješno su sastavljeni finalni plazmidni konstrukti metodom *Golden Gate* kloniranja s koordiniranom koekspresijom gena: dCas9-DNMT3A, mRuby3 i SBP-ΔLNGFR te s molekulom gRNA. Jedan finalni konstrukt sadržavao je dCas9-DNMT3A s aktivnom katalitičkom domenom DNMT3A – *Assembly 1*, a drugi s inaktiviranom istom domenom – *Assembly 2*.
- Stanična populacija FreeStyle 293-F uspješno je transfecirana konstruktom *Assembly 2* što je potvrđeno u 14.5% stanica detekcijom fluorescentnog biljega mRuby3.
- Metodom imunofluorescencije vizualizirana je prisutnost rekombinantnog proteina SBP-ΔLNGFR na membranama transfeciranih stanica 24 sata nakon transfekcije, dok nakon 48 i 72 sata njegova prisutnost više nije zabilježena.
- Sortiranje transfecirane populacije stanica FreeStyle 293-F metodom MACS prema protokolu *Miltenyi Biotec* nije dalo pozitivan rezultat niti nakon jednog od tri ispitana vremenska razdoblja: 24, 48 i 72 sata nakon postupka transfekcije.
- Predlažemo ponoviti isti protokol obilježavanjem stanica s većim brojem paramagnetičkih kuglica. Također predlažemo isprobati alternativni protokol s kuglicama *Dynabeads Biotin Binder* proizvođača *Invitrogen*.

7 LITERATURA

1. Bajar BT, Wang ES, Lam AJ, Kim BB, Jacobs CL, Howe ES, Davidson MW, Lin MZ, Chu J. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. Sci Rep. 2016;6:20889.

2. Chivers CE, Crozat E, Chu C, Moy VT, Sherratt DJ, Howarth M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. Nat Methods. 2010;7(5):391-393.

3. Dainiak MB, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. Methods in Cell Separations. In: Cell Separation. Vol 106. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007:1-18.

4. Grützkau A, Radbruch A. Small but mighty: How the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. Cytom Part A. 2010;77(7):643-647.

5. Han H, Liu Q, He W, Ong K, Liu X, Gao B. An efficient vector system to modify cells genetically. PLoS One. 2011;6(11):e26380.

6. Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, Marraffini LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. Nature. 2015;519(7542):199-202.

7. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. Genes Dis. 2018;5(1):1-8.

8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337(6096):816-821.

9. Kerényi F, Tarapcsák S, Hrubi E, Baráthne SÁ, Hegedüs V, Balogh S, Bágyi K, Varga G, Hegedüs C. Comparison of sorting of fluorescently and magnetically labelled dental pulp stem cells. Fogorv Sz. 2016;109(1):29-33.

10. Luke GA, Ryan MD. The protein coexpression problem in biotechnology and biomedicine: virus 2A and 2A-like sequences provide a solution. Future Virol. 2013;8(10):983-996.

11. Marraffini LA. The CRISPR-Cas system of Streptococcus pyogenes: function and applications. Streptococcus pyogenes Basic Biol to Clin Manifestations. 2016:1-13.

12. Matheson NJ, Peden AA, Lehner PJ. Antibody-free magnetic cell sorting of genetically modified primary human CD4+ T cells by one-step streptavidin affinity purification. PLoS One. 2014.

13. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry. 1990;11(2):231-238.

14. Naamati A, Williamson JC, Greenwood EJ, Marelli S, Lehner PJ, Matheson NJ. Functional proteomic atlas of HIV infection in primary human CD4+ T cells. Elife. 2019;8.

15. Øren A, Husebø C, Iversen A-C, Austgulen R. A comparative study of immunomagnetic methods used for separation of human natural killer cells from peripheral blood. J Immunol Methods. 2005;303(1-2):1-10.

16. Plouffe BD, Murthy SK, Lewis LH. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: A review. Reports Prog Phys. 2015;78(1):016601.

17. Pulecio J, Verma N, Mejía-Ramírez E, Huangfu D, Raya A. CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. Cell Stem Cell. 2017;21(4):431-447.

18. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013;8(11):2281-2308.

19. Savell KE, Day JJ. Applications of CRISPR/CAS9 in the mammalian central nervous system. Yale J Biol Med. 2017;90(4):567-581.

20. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011;473(7347):337-342.

21. Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. Improved Safety of Hematopoietic Transplantation with Monkey Embryonic Stem Cells in the Allogeneic Setting. Stem Cells. 2006;24(6):1450-1457.

22. Vieira J, Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. Gene. 1991;100:189-194.

23. Vojta A, Dobrinić P, Tadić V, Bočkor L, Korać P, Julg B, Klasić M, Zoldoš V. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2016;44(12):5615-5628.

24. Wang JY, Zhen DK, Falco VM, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal nucleated erythrocyte recovery: Fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. Cytometry. 2000;39(3):224-230.

25. Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm Bombyx mori. Sci Rep. 2015;5:16273.

26. Wei Q, Croy BA, Etches RJ. Selection of Genetically Modified Chicken Blastodermal Cells by Magnetic-Activated Cell Sorting. Poult Sci. 2001;80(12):1671-1678.

27. Web stranca: https://international.neb.com/, pristupljeno 20.05.2019.

8 ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime:	Dina Franić

Obrazovanje

rujan 2016.- lipanj 2019.	Diplomski studij molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
rujan 2013.- rujan 2016.	Preddiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
rujan 2009.- lipanj 2013.	XI Gimnazija u Zagrebu, opći smjer

Projekti

rujan 2016.	Seminarski rad pod naslovom *Genska terapija*, Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
travanj 2019.	Pregledni članak pod naslovom *Key achievements in gene therapy development and its promising progress with gene editing tools (ZFN, TALEN, CRISPR/CAS9)* objavljen u časopisu *Molecular and experimental biology in medicine*
ožujak 2018.- lipanj 2019.	Diplomski rad pod naslovom *Sortiranje genetički modificiranih stanica FreeStyle 293-F pomoću magnetnih kuglica konjugiranih sa streptavidinom*, Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Radno iskustvo

ožujak 2017.- lipanj 2017.	Laboratorijska stručna praksa u Endokrinološkom laboratoriju, Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, KBC Sestre Milosrdnice, Zagreb

Nagrade i priznanja

lipanj 2015.	Posebna rektorova nagrada za sudjelovanje na istraživačko-edukacijskom projektu „Grabovača 2014.“ Udruge studenata biologije – BIUS

Znanja i vještine

Laboratorijske metode:	Osnovne metode molekularne biologije, genetičkog inženjerstva i stanične kulture
Strani jezici:	Engleski jezik: B razina