

Konstrukcija vektora za istovremenu ekspresiju teškog i lakog lanca imunoglobulina G u staničnoj liniji HEK293 Freestyle

Bošković, Maria

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:188133>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Maria Bošković

Konstrukcija vektora za istovremenu ekspresiju teškog i lakog lanca
imunoglobulina G u staničnoj liniji HEK293 Freestyle

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte i neposrednim vodstvom mag. biol. mol. Vanje Tadić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno hvala mentoru doc.dr. sc Aleksandru Vojti na ukazanom razumijevanju i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Od srca se zahvaljujem mag. mol. biol. Vanji Tadić na svakom savjetu i velikoj pomoći.

Zahvaljujem se kolegama iz grupe koji su bili spremni priskočiti u pomoć kad god je trebalo.

Hvala prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku.

Hvala mojim prijateljima na nesebičnom razumijevanju i podršci.

Hvala mojoj obitelji i Alenu na beskrajnoj podršci, neizmjerne ljubavi i vjeri u moj uspjeh.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Konstrukcija vektora za istovremenu ekspresiju teškog i lakog lanca imunoglobulina G u staničnoj liniji HEK293 Freestyle

Maria Bošković
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Imunoglobulin G (IgG) se sastoji od lakog i teškog lanca. Njihova posttranslacijska obrada uključuje *N*-glikozilaciju na Fc dijelu. Glikozilacija ima važnu ulogu u modulaciji efektorske funkcije IgG-a. Za ispitivanje glikozilacijskog profila IgG-a te za njegovu manipulaciju (glikoinženjerstvo) koristi se model stanične linije HEK 293 Freestyle. Te stanice rastu u suspenziji, lako se transfeciraju i izlučuju IgG u medij ako su u njih ubačeni vektori za ekspresiju teškog i lakog lanca IgG-a. Ovaj model omogućava istraživanje glikozilacije IgG-a kotransfekcijom vektora za ekspresiju lanaca IgG-a i molekularnih alata koji utječu na regulaciju glikozilacije, kao što su aktivatori ili represori transkripcije bazirani na CRISPR-Cas9 sustavu. Cilj ovog istraživanja je metodama genetičkog inženjerstva konstruirati vektore za istovremenu ekspresiju teškog i lakog lanca IgG-a primjenom dva različita pristupa dizajnu ekspresijskog vektora. Prvi pristup temelji se na bicistranskoj ekspresiji teškog i lakog lanca IgG-a povezanih samocijepajućim peptidom T2A, dok će drugi konstrukt sadržavati dvije ekspresijske kazete (za teški i laki lanac) pod zasebnim promotorima. Nakon transfekcije HEK293 Freestyle stanica konstrukti će se usporediti *dot blot* metodom s obzirom na količinu izlučenog IgG-a.

Uspješno su dobiveni konstrukti sa samocijepajućim peptidom T2A, koji je ubačen u bakterijski soj *E. coli* XL10-Gold u svrhu kloniranja plazmidnih konstrukata. Plazmidni konstrukti uspješno su transfecirali staničnu liniju HEK293 Freestyle. Stanični supernatant je skupljen treći i peti dan te je semikvantitativno uspoređena količina izlučenog IgG-a pomoću metode *dot blot*. Konstrukti s dvije ekspresijske kazete (za teški i laki lanac) pod zasebnim promotorima nije dobiven. Mogući razlog je velika zastupljenost ponavljajućih sljedova zbog čega je bila povećana učestalost rekombinacije u *E. coli* XL10-Gold.

(49 stanica, 14 slika, 2 tablice, 21 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: imunoglobulin G (IgG), teški i laki lanac, glikozilacija, T2A peptid, HEK293 Freestyle, ekspresija

Voditelj: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Neposredni voditelj: mag. biol. mol. Vanja Tadić

Ocjenitelji: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.

Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.

Dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

Rad prihvaćen: 05. listopada 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Construction of a vector for simultaneous expression of immunoglobulin G heavy and light chain in
HEK293 Freestyle cell line

Maria Bošković
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Immunoglobulin G (IgG) contains a light and a heavy chain. The biological activity of IgGs is modulated by the *N*-glycosylation to the fragment crystallizable part. For the research of the glycosylation profile IgGs and glycoengineering technology, it is used HEK 293 Freestyle cell line. The 293 cells grow in a suspension culture, it is easy to transfect them and they excrete IgG in the medium, if we have transfected them with expression system for heavy and light chain of IgGs. Transfecting cells with plasmid vector carrying the heavy chain, the light chain and molecular tools that affect the regulation of glycosylation, such as an activator or repressor of transcription based on CRISPR-Cas9 system, this model allows the research of glycosylation IgG. The aim of this study was to construct vectors for simultaneous expression of a heavy and a light chain of IgGs by using two different approaches for designing expression vectors. The first approach is based on bicistronic expression of the heavy and the light chain of IgGs concatenated with 2A self-processing peptide. The second construct contains two expression cassettes consisting of two promoters that drive the expression of the heavy and the light chain. HEK293Freestyle cells were transfected and compared by a dot blot analysis, considering the amount of the excreted IgGs.

Constructs for production IgGs with T2A self-processing peptide were successfully assembled. For plasmid constructs cloning the bacterial strain *E. coli* XL10-Gold was used. The vectors were transfected into HEK293 Freestyle cell line. Supernatant was collected the third and fifth day post-transfection for semi-quantitative analysis IgGs expression with dot blot method. The system with two expression cassettes (for heavy and light chain) consisting of two promoters wasn't obtained. Possible cause is repetitive sequences which is associated with increased frequency of recombination in *E.coli* XL10-Gold.

(49 pages, 14 figures, 2 tables, 21 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: immunoglobulin G (IgG), heavy and light chain, glycosylation, T2A peptide, HEK293 Freestyle, expression

Supervisor: PhD Aleksandar Vojta, Assistant professor
Assistant Supervisor: mag.biol.mol. Vanja Tadić
Reviewers: PhD Aleksandar Vojta, Assistant professor
PhD Jasna Hrenović, professor
PhD Sofia Ana Blažević, Assistant professor

Thesis accepted: October 05, 2017

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu	1
1.2. Glikozilacija imunoglobulina G.....	2
1.3. Proizvodnja i upotreba antitijela u molekularnoj biologiji.....	4
1.3.1. Monoklonska antitijela u terapiji	4
1.3.2. Glikoinženjerstvo	5
1.3.3. Potreba za visokoučinkovitim sustavom proizvodnje IgG-a.....	5
1.4. Koekspresijski sustav IgG-a.....	7
1.4.1. 2A samocijepajući peptid.....	7
1.4.2. Furin.....	9
1.4.3. Prolazni ekspresijski sustav za proizvodnju antitijela.....	11
2. CILJEVI.....	12
3. MATERIJAL I METODE	13
3.1. Materijal.....	13
3.2. Metode	15
3.2.1. Konstrukcija plazmidnih modula s genima za teški i laki lanac imunoglobulina G	15
3.2.1.1. Konstrukcija modula s genom za laki lanac imunoglobulina G (eng. <i>IgG Light Chain Kappa</i>).....	15
3.2.1.2. Konstrukcija modula s genom za teški lanac imunoglobulina G	22
3.2.2. Golden Gate <i>Assembly</i> -ji plazmidne okosnice i konstruiranih modula s teškim i lakim lancima IgG-a te modula s promotorom i terminatorom za dobivanje finalnog konstrukta za ekspresiju IgG-a	24
3.2.2.1. <i>Assembly</i> IgG-T2A-int	24
3.2.2.2. <i>Assembly</i> IgG-T2A-NoInt	25
3.2.2.3. <i>Assembly</i> IgG-Dual-int.....	25
3.2.2.4. <i>Assembly</i> IgG-Dual-noInt	26
3.2.3. Transfekcija.....	28
3.2.3.1. Održavanje stanica u kulturi	28
3.2.3.2. Transfekcija stanica.....	28
3.2.4. <i>Dot Blot</i>	29
4. REZULTATI.....	31
4.1. Konstrukcija sustava za proizvodnju imunoglobulina G	31
4.2. Transfekcija HEK293 Freestyle i <i>dot blot</i>	38

5. RASPRAVA.....	42
6. ZAKLJUČAK.....	45
7. LITERATURA	46
8. ŽIVOTOPIS.....	47

1. UVOD

1.1. Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu

Mnogi proteini, posebice u eukariotskim stanicama, modificirani su dodatkom ugljikohidrata, u procesu nazvanom glikozilacija. Proteini na koje je vezan ugljikohidratni lanac (tzv. glikoproteini) uglavnom se izlučuju ili su smješteni na staničnoj površini, premda su mnogi jezgri i citosolni proteini također glikozilirani. Neke glikozilacijske reakcije odvijaju se u lumenu endoplazmatskog retikula (ER), druge u *cis*-, *medijalnom* ili *trans*-Golgijevom aparatu. Ugljikohidratni dijelovi glikoproteina imaju važnu ulogu u smatanju proteina i njihovom usmjeravanju kroz ER i Golgijev aparat.

Ovisno o mjestu vezanja ugljikohidratnog bočnog lanca, glikoproteini su podijeljeni na *N*-vezane i *O*-vezane glikoproteine. Kod *N*-vezanih glikoproteina, ugljikohidrat je kovalentno vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina, unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda (X je bilo koja aminokiselina osim prolina). Kod *O*-vezanih glikoproteina, mjesto vezanja ugljikohidrata je kisikov atom bočnog ogranka serina ili treonina. Šećeri izravno vezani na te položaje su *N*-acetilglukozamin kod *N*-vezanih šećera i *N*-acetilgalaktozamin kod *O*-vezanih šećera (Cooper, 2009).

Različita struktura *N*- i *O*-vezanih oligosaharida odražava se u razlikama njihovih biosintetskih putova. *O*-vezani oligosaharidi nastaju dodavanjem jednog po jednog šećera, a svako dodavanje šećera je katalizirano različitim glikoziltransferazama te se oni najčešće sastoje od samo nekoliko ostataka (Helenius & Aebi, 2004). Za razliku od biosinteze *N*-vezanih ugljikohidrata, koja počinje prijenosom osnovnog oligosaharida izgrađenog od 14 šećernih ostataka (dva *N* acetilglukozamina, tri glukoze i devet manoza) na asparagin rastućem polipeptidnom lancu. Tijekom daljnje dorade osnovni se *N*-vezani oligosaharid modificira. Dok se glikoprotein nalazi u ER-u, uklanjanju se tri glukoza ostataka, što je ključno za smatanje proteina. Oligosaharid se dodatno modificira u Golgijevom aparatu u koji se glikoproteini prenose iz ER. *N*-vezani oligosaharidi različitih glikoproteina doraduju se u različitoj mjeri, ovisno o enzimima koji su prisutni u različitim stanicama, kao i o dostupnosti oligosaharida enzimima koji kataliziraju ove modifikacije. Glikoproteini s nedostupnim oligosaharidima ne dobivaju nove šećere u Golgijevom aparatu. Suprotno tomu, glikoproteini s dostupnim oligosaharidima intenzivno se procesiraju što rezultira

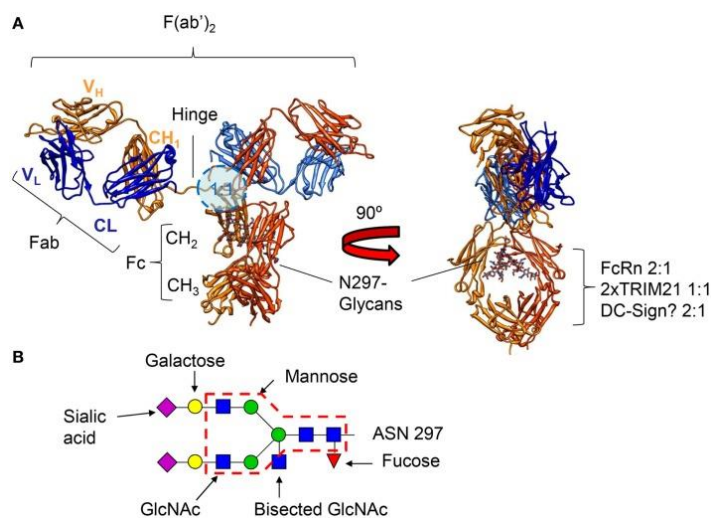
stvaranjem raznolikih kompleksnih oligosaharida. Smatra se da glikozilacija citoplazmatskih i jezgrenih proteina regulira njihovu aktivnost (Cooper 2009).

1.2. Glikozilacija imunoglobulina G

Ljudski imunološki sustav ima sposobnost prepoznavanja velikog broja stranih molekula i na taj način pruža zaštitu organizmu od infektivnih agensa. Na osnovi prirode imunološkog odgovora, imunološki sustav možemo podijeliti na humoralnu i staničnu imunost. Humoralnu imunost čine antitijela koja izlučuju B limfociti i cirkulirajući efektorski proteini, dok staničnu imunost čine T limfociti, fagociti i NK stanice. B limfociti izlučuju imunoglobuline koji prepoznaju topljive antigene, a T limfociti na površini nose odgovarajuće receptore. Sisavci stvaraju pet izotipova imunoglobulina; IgM, IgG, IgE, IgD i IgA (Arnold i sur. 2007).

IgG antitijela su pronađena u svim tjelesnim tekućinama. Ona su najzastupljeniji proteini u krvnoj plazmi čovjeka, na koje otpada ukupno 10-20% svih plazmatskih proteina. Njihova serumaska koncentracija iznosi 10-15 mg/mL. Građeni su od dva teška lanca (γ -lanci) koji se sastoje od tri konstantne regije (C_{H1} , C_{H2} i C_{H3}) i jedne varijabilne regije (V_H). Svaki teški lanac je povezan disulfidnom vezom s lakim lancem (λ ili κ) koji je građen od jedne konstantne C_L regije i varijabilne V_L regije (Arnold i sur. 2007).

IgG može biti pocijepan na tri fragmenta od 50 kDa. Dva od tri fragmenta vežu antigen i oni su nazvani F(ab)'2 (F označuje fragment; ab – eng. *antigen binding*, označuje vezanje antigena). Treći fragment nazvan F_c , budući da je sklon kristalizaciji (eng. *fragment crystallizable region*), ne veže antigen, ali ima druga važna biološka svojstva (tj. izvršnu funkciju) koja uključuju posredovanje imunološkog odgovora interakcijom s različitim F_c receptorima. Smatra se da postoje četiri podklase, IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, koje su visoko konzervirane (Vidarsson i sur. 2014).



Slika 1. (A) Kristalna struktura ljudskog IgG1 antitijela, gledana iz dva različita kuta. (B) Pentasaharidna srž N-glikana (preuzeto i izmijenjeno iz Vidarsson i sur. 2014)

Antitijela zahtijevaju kompleksnu staničnu mašineriju za ispravno procesiranje. Potrebno je formiranje disulfidnih veza i brojne posttranslacijske modifikacije, uključujući i glikozilaciju. Pravilna glikozilacija je neophodna za ispravno djelovanje antitijela kako bi se umanjila mogućnost potencijalne autoimunosne reaktivnosti antitijela (Vink i sur. 2013).

Fc domenu imunoglobulina G (IgG) prepoznaju IgG-Fc gama receptori (FcγR) na mijeloidnim i prirodnoćelima (eng. *Natural Killer*, NK) te na taj način prepoznaju svoj cilj i aktiviraju imunološke efektorske stanice. Dodatkom visokokonzerviranog glikana u Fc domenu na poziciju 297, prestaju strukturalne promjene te je nastali glikan predodređen za vezanje određenog tipa FcγR. Suptilne razlike u glikanima na navedenom mjestu mogu utjecati na Fc strukturu, čime posljedično mijenjaju interakcije sa FcγR. Fc glikan sadrži složenu biantenarnu strukturu i sastoji se od *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i manoznih grupa. Sržna struktura može biti produžena dodatkom galaktoze, *N*-acetilneuramične kiseline (sijalinske kiseline), fukoze i GlcNAc. Različita zastupljenost različitih glikoformi varira među pojedincima (Rademacher i sur. 1988). Ovisno o vrstama, staničnom tipu i fiziološkom statusu domaćina koji proizvodi glikoproteine, uzorak glikozilacije se može značajno razlikovati (Dicker & Strasser, 2015). Naime, dokazane su značajne razlike koje su povezane sa starošću pojedinca, različitim infekcijama i trudnoćom. Tip glikozilacije ovisi o razini ekspresije glikoziltransferaza i glikozidaza u sekrecijskom putu B plazma stanica koje proizvode antitijela, izuzevši sijalizaciju koja ovisi o ekspresiji vanstaničnih sijaliltransferaza (Dekkers i sur. 2016).

Još otprilike je poznato da odsustvo fukoze u IgG-Fc sržnoj strukturi znatno povećava vezanje na Fc γ RIII, te bi ovo znanje moglo biti iskorišteno u svrhu poboljšanja efikasnosti antitijela korištenih u terapeutske svrhe (Dekkers i sur. 2016). IgG proizveden u humanom imunološkom odgovoru sadrži visoki udio fukoze, pa smanjenje njenog udjela posljedično može izazvati alogenični imunološki odgovor koji je usmjeren protiv crvenih krvnih stanica i trombocita, što u konačnici izaziva bolest. No, imunološki odgovor sa smanjenom fukozilacijom u srži IgG-a može biti direktno iskorištena u liječenju HIV-a, ali u kontroliranim uvjetima. O funkcionalnosti ostalih glikozilacijskih karakteristika zna se mnogo manje. Primjerice, pridodavanjem bisekcijskog GlcNAc na G0 glikan može povećati ADCC (engl. *Antibody dependent cell mediated cytotoxicity*) (Dekkers i sur. 2016). U svrhu ispitivanja različitih efekata glikozilacijskih osobina, razvijeno je glikoinženjstvo za manipulaciju IgG Fc-glikana.

1.3. Proizvodnja i upotreba antitijela u molekularnoj biologiji

1.3.1. Monoklonska antitijela u terapiji

Monoklonska antitijela važna su klasa terapeutskih agensa koja se danas koriste u svrhu liječenja širom rasprostranjenih bolesti, uključujući tumorska oboljenja, autoimune bolesti i neke infektivne bolesti (Ohtsubo & Marth, 2006). Do sada je odobreno 20 različitih monoklonskih antitijela za terapijsku primjenu. Mnoge terapije koje su zasnovane na ovakvoj vrsti liječenja zahtijevaju učestalu primjenu visokih doza monoklonskih antitijela (intravenoznom perfuzijom) kako bi se postigla i održala njihova visoka razina u serumu za optimalnu kliničku efikasnost. Metoda kojom bi se omogućio dugotrajni tretman monoklonskim antitijelima je *in vivo* ubacivanje vektora, čime bi se potakla proizvodnja željenih antitijela u organizmu oboljelog (Fang i sur. 2007). Na samim počecima humane genske terapije, bilo je moguće provesti uspješnu terapiju koristeći jedan transgen. Prva uspješna genska terapija kod ljudi zabilježena je kod liječenja četverogodišnje Ashanti DaSilva koja je bolovala od kombinirane imune deficijencije (eng. *SCID*), gdje je lezija defektnog gena (adenozin deaminaza) zamijenjena funkcionalnom kopijom istog. Za gensku terapiju humanih genetskih bolesti često je potrebno proizvesti terapeutske proteine na način da više različitih gena bude istovremeno eksprimirano unutar iste stanice (Luke & Ryan, 2013).

1.3.2. Glikoinženjerstvo

Glikoinženjerstvo omogućava razvijanje glikoproteinskih terapeutika sa smanjenim nuspojavama i povećanom aktivnošću (Dicker & Strasser, 2015). Mnogi proteinski lijekovi su glikozilirani i imaju pridodane glikanske strukture koje utječu na terapeutska svojstva. Broj i sastav glikana ima važnu ulogu za smatanje proteina, njihovu topljivost i unutarstanični transport. Stoga glikozilacija ima veliku ulogu na biološku aktivnost glikoproteina i upravo iz tog razloga treba biti dobro kontrolirana tijekom proizvodnje kako bi se postigla optimizirana terapijska efikasnost. Usljed prepoznavanja važnosti glikoproteina u terapiji, proteklih godina postignut je znatan napredak za prevladavanje glikanske heterogenosti i uspostavljeno je *in vivo* i *in vitro* glikoinženjerstvo za efikasnu proizvodnju homogenih terapeutskih glikoproteina (Dicker & Strasser, 2015).

Genetička manipulacija glikoziltransferaza ili drugih gena uključenih u biosintezu glikana pruža mogućnost mijenjanja subpopulacije glikana u stanicama i organizmu. Razvijene su različite metode glikoinženjerstva; delecije gena ili *knockout*, *knockdown* pomoću RNAi ili upotreba molekularnih alata baziranih na CRISPR/Cas sustavu za aktivaciju ili represiju transkripcije (Griffin & Hsieh-Wilson, 2016).

1.3.3. Potreba za visokoučinkovitim sustavom proizvodnje IgG-a

Važnost istovremene ekspresije više od jednog proteina unutar iste stanice istaknuta je kod proizvodnja antitijela. Naime, za pravilnu aktivnost imunoglobulina teški i laki lanac moraju istovremeno biti eksprimirani unutar iste stanice. Ovisno o tome kakav produkt želimo, tj. kakvu kombinaciju teškog i lakog lanca trebamo, obje sekvence tih lanaca IgG-a se moraju naći u istoj stanici. Ekspresija teškog lanca u jednoj stanici, a lakog lanca u drugoj ne bi dala funkcionalni produkt (Fang i sur. 2007).

Transfekcija stanica s više različitih plazmidnih DNA (svaka kodira za različiti transgen) dovest će do toga da samo mali broj individualnih stanica istovremeno ekspremira sve željene produkte. Također, dugotrajna stabilna ekspresija zahtijeva ugradnju različitih plazmidnih DNA u genom, a to znači da bi se integracija događala nasumično po čitavom genomu. Dugoročno bi to dovelo do genetičke nestabilnosti, a čime bi došlo do gubitka željenog fenotipa zbog prekida ekspresije jednog ili više gena (Luke & Ryan, 2013).

Kako bi se poboljšala efikasnost istovremene ekspresije, razvijene su različite strategije. Jedna od strategija je ubacivanje više gena na isti plazmid uz korištenje više različitih ili zajedničkih promotora. Također, jedna od opcija je ulančavanje sekvenca kodirajućih proteina pomoću *linkera* u jedinstveni ORF (eng. *open reading frame*). Ako je riječ o imunoglobulinu G, to bi značilo povezati teški i laki lanac sa 2A samocijepajućom sekvencom i mjestom cijepanja koje prepoznaje furin (Fang i sur. 2007).

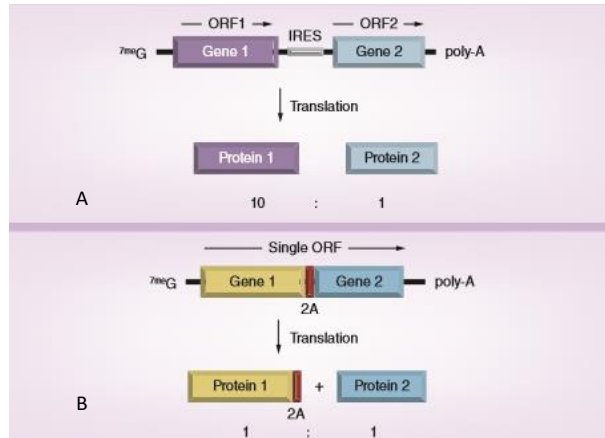
Za kliničku primjenu *in vivo* genske ekspresije imunoglobulina, postoji nekoliko stavki koje treba primijeniti kako bi terapija bila uspješna. Prvo, ekspresija antitijela iz originalnog vektora bi trebala biti regulirana inducibilnim promotorom zato što je u terapijskoj primjeni visoko poželjna regulirana ekspresija; isto tako, trebalo bi biti moguće prekinuti ekspresijski sustav kad bi se postigla idealna razina titra antitijela u serumu oboljelog. Drugo, teški lanac antitijela sadrži dvije dodatne aminokiseline na C-terminusu koje su ostatci furinskog cijepajućeg mjesta (teški lanac + arginin i alanin), što potencijalno može promijeniti aktivnost antitijela (Fang i sur. 2007). Stoga je potrebna ekspresija nemodificiranog, nativnog monoklonskog antitijela za njegovu ispravnu aktivnost *in vivo* čime bi se stvorila nova mogućnost upotrebe terapijskih antitijela u klinici putem genske terapije.

1.4. Koekspresijski sustav IgG-a

Istovremena ekspresija više gena vrijedna je metoda u brojnim eksperimentalnim pristupima. Znanstvenici su za tu svrhu razvili više pristupa, uključujući kotransfekciju dva ili više plazmida, zatim korištenje više promotora ili promotora koji potiču transkripciju u dva smjera, ili stvaranjem bicistranskih (multicistranskih) vektora. Za razliku od promotora, koji formiraju jedinstven mRNA transkript za svaki gen koji se eksprimira, bicistranski i multicistranski vektori istovremeno ekspimiraju dva ili više neovisna proteina iz iste mRNA (<http://blog.addgene.org/plasmids-101-multicistronic-vectors>).

1.4.1. 2A samocijepajući peptid

Sustav istovremene ekspresije je razvijen po uzoru na RNA viruse. Omogućuje istovremenu ekspresiju više proteina koji se nalaze pod jednim, zajedničkim promotorom (Luke & Ryan, 2013). Dva najviše korištena elementa u multicistranskim vektorima su IRES (eng. *Internal Ribosome Entry Site*) elementi i 2A peptidi (Slika 2). IRES elementi su manje zastupljeni od 2A peptida u takvim vektorima jer su veliki (500-600 pb). Također, pomoću IRES elemenata ne mogu se dizajnirati vektori s više od dva gena i znanstvenici su zabilježili manju ekspresiju nizvodnog cistrona. Za razliku od IRES-a, 2A peptidi imaju približno 20 aminokiselina (<http://blog.addgene.org/plasmids-101-multicistronic-vectors>). Identificirani su brojni 2A peptidi, od kojih je najviše istražen F2A od virusa slinavke i šapa (eng. *foot and mouth disease virus*) i upravo njegov 2A peptid je iskorišten u svrhu ekspresije monoklonskih antitijela u stanicama sisavaca i za *in vivo* gensku terapiju (Chng i sur. 2014). 2A peptidi se samostalno cijepaju između dvije posljednje aminokiseline – glicina i prolina. Dodatkom aminokiselinske sekvence koju prepoznaje proteaza furin između prvog gena i 2A sekvence, uspješno se uklanjaju ostatci slijeda s uzvodnog gena. Umetanjem GSG i SGS *linkera*, V5 (GKPUPNPLLGLDST) ili 3xFlag peptida, može se poboljšati efikasnost cijepanja 2A peptida (Chng i sur. 2014).



Slika 2. Sekvence pikornavirusa koje se koriste u koekspresiji. (A) Bicistronska mRNA s IRES elementom. Translacijom nastaje deset puta više proteina 1. (B) Bicistronska mRNA s ulančanim genima u jedan ORF pomoću peptida 2A. Translacijom nastaju dva proteina u jednakom ekvimolarnom omjeru. ^{7me}G: 7-metilgvanozinska kapa, poly A: poli-A-rep, ORF: eng. *Open Reading Frame* (Preuzeto i izmijenjeno iz Luke & Ryan, 2013).

Struktura genoma pikornavirusa, poput virusa FMDV, ima istu građu kao stanična mRNA; 5' nekodirajuću regiju, jedan ORF (koji kod pikornavirusa kodira za poliprotein), 3' nekodirajuću regiju i poli-A-rep. Pikornavirusi istovremeno ekspiriraju kapsidne proteine, proteine uključene u izmjenu stanične makromolekularne strukture i metabolizma domaćina, proteine za replikaciju virusnog RNA genoma – sve iz jednog ORF-a. To je moguće zato što virus kodira vlastite proteinaze (također domene poliproteina) te na taj način pocijepa poliprotein na specifičnim mjestima kako bi procesirao pojedinačne produkte (Luke & Ryan, 2013).

Kotranslacijsko cijepanje FMDV poliproteina za pravilno procesiranje zahtijeva na C-terminusu 2A sekvencu (dugu 18 aminokiselina). Analize rekombinantnog FMDV poliproteina upućuju na to da se FMDV 2A oligopeptid pojavljuje kako bi posredovao u cijepanju poliproteina bez prisustva ostalih proteina FMDV. Ova hipoteza kasnije je potvrđena na način da je umetnuta sekvenca FMDV 2A u umjetno sintezirani poliproteinski sustav te je tako dokazano da oligopeptidna sekvenca FMDV 2A potpomaže cijepanje s visokom efikasnošću (>90%). Peptid 2A je prvo opisan u FMDV-u, iako je on prisutan i kod drugih pikornavirusa. 2A ekspresijski sustav uspješno je testiran na kvascima, biljkama, insektima i na stanicama sisavaca (Luke & Ryan, 2013).

Nedostatci 2A sustava su sljedeći: ovaj sistem ne funkcioniira u prokariotskim stanicama, 2A oligopeptidna sekvenca ostavlja na C-terminusu 18-25 aminokiselinskih ostataka te nizvodni

protein mora na N-terminusu imati rezidualni prolin. Zbog navedenih razloga 2A sustav je daleko od idealnog, ali unatoč tomu je koristan alat u biomedicini i biotehnologiji (Luke & Ryan, 2013).

1.4.2. Furin

Furin je stanična endoproteaza koja proteolitički aktivira veliki broj prekursora proteina u različitim djelovima sekretornog puta (Thomas, 2002). Niz studija (Jostock i sur. 2010; Hans i sur. 2009; Tian i sur. 2011) je pokazalo kako se može efikasno proizvesti monoklonsko antitijelo čije se sastavnice (teški i laki lanac) nalaze u jednom ORF-u povezane s 2A samoprocesirajućom sekvencom, koja je uzeta od virusa FMDV, i furinskim cijepajućim mjestom. Smatra se da se u sekretornom putu mnogi proteini inicijalno sintetiziraju kao inaktivni prekursori proteina te proteolitičkim cijepanjem tih prekursora, pomoću furina, nastaju biološki aktivni proteini (Tian i sur. 2011).

Fukcionalno, furin ima dvije glavne substancične lokalizacije: u *trans*-Golgijskoj mreži i na staničnoj površini. U *trans*-Golgijskoj mreži, furin cijepa i aktivira brojne stanične supstrate poput izvanstaničnih proteina matriksa, signalnih peptida, faktora rasta, serumskih proteina, staničnih transmembranskih receptora i ionskih kanala. Na staničnoj površini, furin cijepa brojne patogene supstrate kao što su bakterijski toksini i viralni fuzijski peptidi. Brojni proteini koji postaju aktivni cijepanjem furina uključeni su u širom rasprostranjene humane bolesti poput patogenih infekcija, neuroloških bolesti, u tumorigenezu, invaziju tumora, angiogenezu i metastaze tumora (Tian i sur. 2011).

Važan korak kod cijepanja furinom je prepoznavanje specifičnog cijepajućeg mjesta (motiva) koje predstavlja supstrat za furin. Furin cijepajuća sekvenca uzeta iz originalne kazete bila je RAKR. Masenom spektrometrijom je dokazano kako teški lanac antitijela, nastao iz jednog ORF-a u kojem su teški i laki lanac bili povezani s 2A samoprocesirajućom sekvencom i furinom, sadrži dva dodatna aminokiselinska ostatka (arginin i alanin) na C-terminusu. Brojnim sekretornim proteinima se modificira C-terminus karboksipeptidazama na način da uklanjaju bazične aminokiselinske ostatke (K i R) sa C-terminusa. Arginin i alanin, ostatci na teškom lancu imunoglobulina, neće biti uklonjeni od strane karboksipeptidaza zato što druga aminokiselina (A) u furinskom cijepajućem mjestu (RAKR) nije bazična (Fang i sur, 2007). No, konsenzus sekvence furin cijepajućeg mjesta R-X-K/R-R daje mogućnost odabira aminokiseline na drugoj i trećoj

poziciji. Time bi se mogla poboljšati efikasnost procesiranja teškog lanca imunoglobulina kako bi se dobilo nemodificirano monoklonsko antitijelo. Fang i suradnici (2007) konstruirali su četiri ekspresijske kazete antitijela sa različitim sekvencama furin cijepajućeg mjesta kako bi usporedili efikasnost procesiranja. Dizajnirane su sljedeće kombinacije: RRRR, RKRR, RRKR, RKKR, a da bi ispitali heterogenost posljednje aminokiseline teškog lanca, oformili su jedan konstrukt koji je sadržavao sekvencu teškog lanca s delecijom zadnjeg lizina, nakon čega je uslijedila RKRR furinska sekvenca, 2A sekvenca te laki lanac. Ovaj konstrukt je nazvan (Δ K)RKRR. Korištena je sekvenca ljudskog imunoglobulina IgG4 za sve kazete pod CAG promotorom i transfecirane su jajne stanice kineskog hrčka (eng. *Chinese hamster ovary cells, CHO*). Antitijela su pročišćena iz staničnog supernatanta te je masenom spektrometrijom utvrđeno da su proizvedena antitijela bez aminokiselinskih ostataka na C-terminusu teškog lanca kod RRRR, RKRR i RRKR furin cijepajućeg mjesta. Za razliku od njih, kazeta sa RKKR furin cijepajućim mjestom imala je aminokiselinske ostatke u 18.3% proteinskih produkata antitijela. Konstrukt sa (Δ K)RKRR je također rezultirao potpunim uklanjanjem aminokiselinskih ostataka na teškom lancu imunoglobulina. Ovim istraživanjem pokazano je kako furin-cijepajuća mjesta koja sadržavaju sve bazične aminokiseline olakšavaju ekspresiju homogenog, nativnog i cjelovitog antitijela *in vitro* koristeći jedan ORF (Fang i sur. 2007).

Chng i suradnici (2014) su pokazali da je za dobivanje pravilno procesiranih teških i lakih lanaca imunoglobulina potrebno cijepanje na furinskom i na 2A mjestu. Nepotpunim cijepanjem nastaju teški lanac-2A-laki lanac fuzijski proteini i teški ili laki lanci s rezidualnim ostacima 2A. GSG *linker* povećava efikasnost cijepanja i na furinu i na 2A mjestu. Osim toga, GSG omogućava povećanje efikasnosti cijepanja na oba mjesta tako da olakšava formiranje povoljnih konformacija povećanjem izlaganja furinskog mjesta na proteinsku površinu čime prevenira inhibiciju cijepanja 2A peptida koji se nalazi uzvodno od njega (Chng i sur, 2014).

1.4.3. Prolazni ekspresijski sustav za proizvodnju antitijela

Prolazna ekspresija u stanicama sisavaca postala je metoda izbora za proizvodnju antitijela. Brzina i prinos antitijela u dostupnim prolaznim ekspresijskim sustavima i prirodne posttranslacijske modifikacije favoriziraju ovaj sustav za ekspresiju u nižim eukariotima, prokariotima i stabilnim staničnim linijama. Za takvu ekspresiju, pretežno se koriste stanične linije HEK-293 (eng. *Human embryonic kidney 293*) i CHO-K1 (eng. *Chinese hamster ovary*). Obje stanične linije se mogu prilagoditi za suspenzijsku staničnu kulturu i njihovi klonovi rastu u kemijski definiranom mediju do visoke stanične gustoće. Zbog lakoće transfekcije, visokog ekspresijskog prinosa i native humane glikozilacije, HEK-293 najviše se koriste u ove svrhe.

Pokazalo se da u HEK-293 stanicama dolazi do jake transkripcijske aktivnosti korištenjem promotora humanog citomegalovirusa (CMV). Kotransfekcijom ekspresijskog pojačivačkog vektora te povećanjem vijabilnosti i broja stanica koekspresijom antiapoptičnih proteina, dodatno se može potaknuti proizvodnja proteina. Inhibitori staničnog ciklusa stabiliziraju staničnu liniju u staničnom ciklusu koji je najpogodniji za proizvodnju proteina. Pratitelji proteina (eng. *chaperones*) mogu poboljšati kvalitetu smatanja proteina, a brojni viralni proteini mogu pojačati razinu proizvodnje (Vink i sur. 2014). Vink i suradnici posebno ističu veliki T antigen SV40 virusa (SVLT) kao snažan pojačivač proizvodnje proteina. Oni su razvili visoko efikasan i jednostavan prolazni ekspresijski sustav uvođenjem tri ekspresijska pojačivačka proteina – SVLT, p21 i p27, određivši idealan omjer antitijela i pojačivačkih ekspresijskih vektora. Sustav koji su razvili omogućava proizvodnju humanog IgG-a do 400 mg/ml skaliranjem volumena od 0,1 pa do 1200 ml.

2. CILJEVI

- Kloniranje teškog i lakog lanca imunoglobulina G u plazmidne module koji će omogućiti sklapanje *Golden Gate* pristupom u finalne sustave za ekspresiju imunoglobulina G u staničnoj kulturi.
- *Golden Gate* sklapanje plazmidnih modula s teškim i lakim lancem IgG-a s plazmidnom okosnicom i preostalim modulima finalnih sustava za ekspresiju IgG-a; *assembly-IgG-T2A* sadržavat će teški i laki lanac IgG-a povezan s kratkim samocijepajućim peptidom T2A, što će omogućiti ekspresiju bicistranskog transkripta. Konstrukt *assembly-IgG-Dual* sadržavat će dvije ekspresijske kazete – za teški i za laki lanac – pod zasebnim promotorima.
- Transfekcija stanične kulture HEK293 Freestyle s finalnim sustavima za ekspresiju IgG-a.
- Prikupljanje staničnih supernatanata i njihova analiza *dot blot* metodom u svrhu provjere izlučivanja IgG-a.
- Odabir najefikasnijeg sustava za ekspresiju IgG-a za primjenu u daljnjim istraživanjima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Komercijalni setovi kemikalija:

EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara, Tokio, Japan); Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, SAD), QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen, Hilden, Njemačka); Agilent Kit za mutagenezu (Santa Clara, SAD); Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, SAD); EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara, Tokio, Japan).

Enzimi:

XhoI (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *PstI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); Thermo ScientificFastAP Thermosensitive AlkalinePhosphatase (Waltham, Massachusetts, SAD); T4 DNA ligaza 1 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); *BsBI* (BpiI) (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); Egzonuclease V (10 000 U/mL, New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *PstI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *SacI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *NcoI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *KasI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *BsaI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); *BsmBI* (New England Bio Labs, Ipswich, Massachusetts, SAD); T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio, SAD).

Plazmidni vektori: pUK21gg, T2A modul, tNS-pPro-CBh, tNS-pTer-H, plazmidna osnovica (pUC19BB_newBB+SV40_ori)

Boje i markeri molekulskih masa:

100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonija); etidij-bromid; Gel Loading Dye Purple 6x (BioLabs, Inc); GelPilot DNA Loading Dye (Qiagen, Mainz, Njemačka); GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Mass Ruler DNA Ladder Mix ready to use (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Ostalo:

10xNEBuffer 3.1, 2.1, 1.1 i 10xCutSmart (New England, Bio Labs); Luria-Bertani (LB) tekući medij (10 g/L ekstrat kvasca, 5 g/L BactoTrypton, 10 g/L NaCl); Luria-Bertani (LB) agar (5 g/L ekstrat kvasca, 10 g/L BactoTryptone, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar); destilirana voda; pufer TAE (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA pH 8.0); agarozna (Sigma Aldrich, Švicarska); Početnice (Macrogen, Seoul, Koreja); 50%-tni glicerol; T4 Ligation Buffer; T4 Polinukleotid Kinaza (Takara, Tokio, Japan), 10x Buffer G (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); 10x FastAP Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); ATP (10mM); DTP (10mM); 10x Egzonuclease V Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Oligo Početnice (100 µM) (Macrogen, Amsterdam, Nizozemska); G Block Gene Fragments teškog lanca IgG-a (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD); 293-Fectin, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); 293 ExpressionMedium, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); IPTG (100µM); xGal (20 mg/mL); SYBR Safe DNA gel stain (10 000x concentrate in DMSO) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); kanamicin (50 mg/ml); ampicilin (100 mg/ml); 6 well plate (CytoOne, Starlab, Velika Britanija); 1xPBS (100 ml/L 10xPBS); Nitrocellulose Blotting Membrane Premium 0,45 µm (Amersham Protan, Njemačka); Milchpulver (Carl Roth, Austrija); PBST (1:1000 Tween u 1xPBS); antitijelo Ab97225 Goat anti-human IgG-Fc (Abcam, Cambridge, Velika Britanija); Detection Reagent 1 (*Luminol Enhancer Solution*) i 2 (*Peroxide Solution*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Carestream Kodak autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma Aldrich, Švicarska); Carestream Kodak autoradiography GBX fixer/replenisher (Sigma Aldrich, Švicarska); fotografski papir (GE Healthcare Limited, Velika Britanija).

Bakterijski soj:

XL10-Gold, NEB Stable

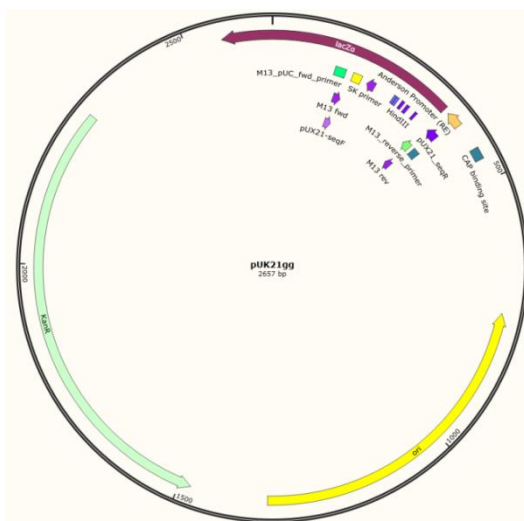
Stanična linija:

HEK293 Freestyle

3.2. Metode

3.2.1. Konstrukcija plazmidnih modula s genima za teški i laki lanac imunoglobulina G

Plazmid pUK21gg (2657 pb), 432 pb kraći oblik plazmida pUK21, iskorišten je kao prijenosni vektor za kloniranja (eng. *shuttle vector*). pUK21gg služi kao okosnica za kloniranje gena za teški (1499 pb) i laki lanac (955 pb) u iduće module, te sadrži biljag za rezistenciju na kanamicin, *KanR* (Slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz prijenosnog vektora za kloniranje pUK21gg.

3.2.1.1. Konstrukcija modula s genom za laki lanac imunoglobulina G (eng. *IgG Light Chain Kappa*)

Iz laboratorija prof. Vidarssona (Sanquin, Amsterdam, Nizozemska) dobiven je gen za laki lanac imunoglobulina G unutar klasičnog ekspresijskog plazmida pcDNA3.1. Za umnažanje sekvence lakog lanca IgG-a, dizajniran je par djelomično komplementarnih oligonukleotida Ig-PstI-tNS-1-FW i corr-Igk-tNS-4-XhoI-RE, koji na svojim krajevima sadrže restrikcijska mjesta za daljnje kloniranje u prijenosne i odredišne vektore (Tablica 1). Pomoću tih specifičnih početnica PCR metodom je umnožen gen za laki lanac IgG-a. Korišten je *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD), prema uputama proizvođača. Tri tubice sa kalupom plazmidne DNA postavljene su na različitim temperaturama prijanjanja početnica (60°C, 65°C i 70°C) zbog optimizacije metode jer pri višim temperaturama povećavamo specifičnost vezanja početnica, no ove početnice sadrže i velike nekompatibilne dijelove s dodatnim restrikcijskim mjestima, zbog

čega je potrebna optimizacija reakcije. Po završetku PCR reakcije na 1%-tnom agaroznom gelu potvrđena je uspješnost umnažanja sekvence lakog lanca IgG-a. Elektroforeza je trajala 40 minuta uz jakost električnog polja od 10 V/cm, nakon čega je gel obojan etidij-bromidom u svrhu vizualizacije PCR produkta pod transiluminatorom s UV svjetlom.

Nakon potvrde da je umnožena željena sekvenca, napravljena je PCR reakcija s polimerazom visoke točnosti *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent, SAD), za daljnje postupke kloniranja. PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2 min početne denaturacije na 95°C; 30 ciklusa od 20 s denaturacije na 95°C, 20 s prijanjanja početnica na 60°C, 30 s elongacije na 72°C; 3 min završne elongacije na 72°C. PCR produkt je pročišćen pomoću seta *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača te je koncentracija plazmidne DNA izmjerena na NanoVue uređaju (GE Healthcare Life Sciences, SAD).

Napravljene su digestije *shuttle* vektora pUK21gg i PCR produkta lakog lanca sa restrikcijskim endonukleazama *PstI* i *XhoI* (New England Biolabs, SAD) kako bi se dobili kompatibilni krajevi. Digestija je rađena u puferu NEBuffer 3.1 (New England Biolabs, SAD) jer oba enzima imaju najveću aktivnost u njemu, dodano je po 200 ng svake DNA, 1 µl svakog enzima te destilirane vode do 30 µl. Reakcija je postavljena u PCR uređaj na 37°C, 2 sata. Po završetku digestije napravljena je defosforilacija porezanog vektora alkalnom fosfatazom *Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific, SAD) u 20 µl reakcijske smjese sa 100 ng plazmidne DNA kako bi se umanjila mogućnost intramolekularne ligacije samog vektora. Reakcija je postavljena u termobloku 20 min na 37°C uz inaktivaciju enzima 5 min na 75°C.

Nakon restrikcije i defosforilacije, napravljena je ligacija porezanih vektora i inserta sa kompatibilnim krajevima pomoću T4 ligaze DNA (Takara Bio, SAD). Potrebna količina inserta je izračunata prema zadanoj formuli u 3:1 omjeru insert-vektor te je u reakciju dodano 54 ng DNA i 50 ng DNA vektora. Reakcijska smjesa je sadržavala još i 2 µl 10x T4 DNA Ligase Buffer, 0,5 µl T4 Ligase (2,5U) i destiliranu vodu do ukupnog volumena od 20 µl. Pripremljene su dvije PCR tubice; u jednoj je pripremljena reakcijska smjesa sa insertom i vektorom, a u drugu je dodan samo porezani vektor (služi kao kontrola-recirkularizirani vektor). Reakcijske smjese su inkubirane na 22°C, 10 min.

Ligacijska reakcija transformirana je u kemijski kompetentne bakterije XL10-Gold (Agilent, SAD). Alikvoti kompetentnih bakterija su prebačeni sa -80°C na led (10 minuta), u svaki alikvot je dodano po 5 μl ligacijske smjese. Ponovno je uslijedila inkubacija na ledu 10 minuta, nakon čega su bakterije transformirane u vodenoj kupelji 35s na 42°C . Oporavljane su na ledu 2 minute te je dodan topli LB medij (450 μl) u svaki bakterijski alikvot. S obzirom da je korištena kanamicinska podloga za selekciju transformanata, bakterije su prije razmazivanja na ploče oporavljane na tresilici 1 sat na 37°C i 300 rpm. Po 100 μl alikvota transformiranih bakterija razmazano je na LB-kanamicinske ploče, nakon čega je uslijedila inkubacija na 37°C , 16 sati.

Odabrane su početnice za *colony* PCR pomoću *Snapgene* programa (GLS Biotech, SAD), pUX21_seqF i pUX21_seqR. Kalup za *colony* PCR je po jedna narasla kolonija sa kanamicinskih ploča. Odabrano je nasumično deset kolonija. PCR reakcija je složena prema protokolu za *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) u ukupnom volumenu 25 μl , a nakon PCR reakcije produkti su analizirani elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu. Na gelu je uočena očekivana veličina produkta, čime je potvrđena uspješnost kloniranja. Nakon utvrđivanja pozitivnih klonova, pripremljene su prekonočne kulture četiri klona i negativne kontrole u LB mediju sa kanamicinom. Prekonočne kulture inkubirane su na tresilici, 16 sati na 37°C .

Nakon inkubacije prekonočnih kultura odabranih bakterijskih klonova, pripremljeni su 25%-tni glicerolski štokovi za čuvanje plazmidnih DNA. Od svake prekonočne kulture uzeto je po 500 μl i prebačeno u novu tubicu s čepom na navoj. U svaku tubicu dodano je po 500 μl 50%-tnog glicerola i lagano izmiješano. Pripremljen štok je zamrznut na -80°C . Tako pripremljene plazmidne DNA mogu se dugo čuvati.

Pročišćen je bakterijski lizat te je izolirana plazmidna DNA pomoću *Wizard Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača, a koncentracije i čistoća pročišćenih plazmidnih DNA izmjerene su na NanoVue uređaju. Odabrana četiri klona poslana su na sekvenciranje prije daljnjeg kloniranja. Korištene su usluge servisa Macrogen (Amsterdam, Nizozemska), te su uzorci za sekvenciranje razrijeđeni i pripremljeni prema zadanim smjernicama *Sample Preparation Guide* sa web stranice Macrogen-a.

Ispravnost sekvenci rekombinantnih plazmida potvrđena je obradom rezultata sekvenciranja u *Snapgene* programu. Odabran je jedan ispravan klon pUK21gg-LC, visoke koncentracije i čistoće, za daljnja kloniranja.

Sekvence svih oligonukleotida korištenih tijekom kloniranja navedene su u Tablici 1. Svi oligonukleotidi sintetizirani su po narudžbi u Macrogen servisu za sintezu oligonukleotida (Seul, Južna Koreja).

Kako je za *Golden Gate* kloniranje potreban enzim *BsaI*, bilo je ključno ukloniti to restriksijsko mjesto iz sekvence introna unutar gena lakog lanca da bi se kasnije moglo uspješno izvesti *Golden Gate* kloniranje. U tu svrhu je napravljena mutageneza *BsaI* mjesta unutar introna kao jedan pristup i izbacivanje introna iz sekvence gena pomoću hibridiziranih oligonukleotida kao drugi pristup.

Mutageneza *BsaI* mjesta u intronu lakog lanca imunoglobulina G

Palindrom kojeg prepoznaje restriksijski enzim *BsaI* je GGTCTC. U ovoj mutagenezi je promjenjen drugi G u C da bi dobiveno mjesto izgledalo: GCTCTC, čime bi bilo spriječeno prepoznavanje *BsaI* na tom mjestu u intronu gena lakog lanca. Korišteni su mutageni oligonukleotidi LC_noBsaI-S i LC_noBsaI-A (Tablica 1).

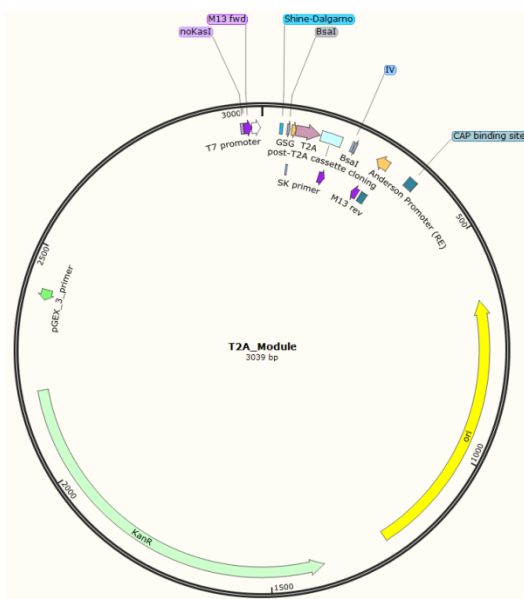
Mutageneza je napravljena na odabranom ispravnom klonu pUK21gg-LC pomoću seta *QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent, SAD), prema protokolu proizvođača. Pripremljene su dvije reakcijske smjese; jedna s 50 ng DNA kalupa, a druga sa 100 ng. Uvjeti reakcije su postavljeni prema propisanom protokolu. Po završetku mutageneze, u svaku reakciju je dodano po 2 µl enzima *DpnI* kako bi se pocijepao nemutagenizirani 'roditeljski' kalup. Postavljena je reakcija na 37°C, 10 min. Uslijedila je transformacija XL10-Gold kemijski kompetentnih bakterija prema već navedenom protokolu, te razmazivanje bakterija na LB-kanamicinske selektivne podloge. Sutradan je napravljen *colony* PCR pomoću *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) i odabrani su pozitivni klonovi. Pripremljene su prekonoćne kulture iz kojih su napravljene glicerolski štokovi i izolirana je plazmidna DNA pomoću seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača, koncentracije su izmjerene na NanoVue uređaju. Izolirani klonovi pUK21gg-LC-NoBsaI su poslani na sekvenciranje s univerzalnim početnicama (M13F i M13R) u Macrogen

servis za sekvenciranje (Amsterdam, Nizozemska). Analizom rezultata sekvenciranja je odabran klon s odgovarajućom sekvencom za daljnja kloniranja.

Odabrani ispravni klon pUK21gg-LC-NoBsaI spreman je kao gotovi modul za *Golden Gate Assembly* IgG-Dual-Int, a za potrebe *Golden Gate Assembly*-ja IgG-T2A-Int potrebno je prenijeti insert (laki lanac s mutiranim BsaI mjestom unutar introna) u T2A-modul plazmid.

PCR-om je umnožen insert s plazmida pUK21gg-LC-noBsaI s početnicama LC-BsaI-2-NcoI-FW i LC-BsaI-2-KasI-RE (Tablica 1). Korištena je polimeraza visoke točnosti *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent, SAD). PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2 min početne denaturacije na 95°C; 30 ciklusa od 20 s denaturacije na 95°C, 20 s prijanjanja početnica na 60°C i na 55°C, 1 min elongacije na 72°C; 3 min završne elongacije na 72°C. Dobiven je PCR produkt LC_INT_noBsaI od 956 pb.

T2A-modul plazmid (Slika 4) porezan je s restrikcijским enzimima *NcoI* i *KasI* (New England Biolabs, SAD), a PCR produkt LC_INT_noBsaI porezan je s enzimom *BsaI* (New England Biolabs, SAD). Ovakvim digestijama dobiveni su kompatibilni krajevi koji omogućuju ligaciju inserta LC_INT_noBsaI i vektora, T2A-modul plazmida.



Slika 4. Shematski prikaz T2A-modula.

Napravljena je ligacija porezanog T2A modula i LC_INT_noBsaI u ukupnom volumenu od 20 μ l. Molarni omjer inserta i vektora je 3:1. U reakciju je dodano 50 ng vektorske DNA. Reakcija je postavljena 1 sat na 22°C. Uslijedila je transformacija kemijski kompetentnih bakterija s 3 μ l ligacijske smjese. Na LB-kanamicinske ploče je razmazano 100 μ l alikvota bakterija.

Sutradan je napravljen *colony* PCR pomoću *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) i početnica pUX21_seqF i pUX21_seqR, te su odabrana dva pozitivna klon T2A-modul-LC_INT_noBsaI koji su dali PCR produkt od 1191 pb. Pripremljene su prekonoćne kulture tih klonova, iz kojih su napravljeni glicerolski štokovi i izolirana je plazmidna DNA pomoću seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača. Klonovi su poslani na provjeru sekvenciranjem u Macrogen servis.

Uklanjanje introna sa *BsaI* mjestom unutar lakog lanca imunoglobulina G

Prvo su pripremljeni oligonukleotidi za umetanje u sekvencu lakog lanca, umjesto introna sa *BsaI* mjestom koje želimo izbaciti. Oligonukleotidi LC-BbsI_rm_Intron-S i LC-BbsI_rm_Intron-A sadrže po 65 nukleotida, a dizajnirani su tako da na krajevima sadrže *BbsI* (*BpiI*) restrikcijska mjesta pomoću kojih se ugrađuju u sekvencu lakog lanca između dva *BbsI* (*BpiI*) restrikcijska mjesta, što rezultira potpunim uklanjanjem sekvence introna iz lakog lanca (Tablica 1).

Napravljeno je sparivanje i fosforilacija oligonukleotida u smjesi od 10 μ l. Dodano je 1 μ l T4 ligacijskog pufera, 0,5 μ l T4 polinukleotid kinaze, po 1 μ l *sense* (100 μ M) i *antisense* oligonukleotida (100 μ M) i 6,5 μ l vode. Reakcija je postavljena na 37°C, 30 min nakon čega je slijedila inaktivacija enzima 5 min na 95°C i zatim postupno hlađenje reakcije do 25°C.

Napravljena je ligacija u omjeru 5:1 (insert-vektor) sa 100 ng vektora i 9,17 ng sparenih oligonukleotida od 65 pb (izračunato pomoću NeBio kalkulatoru). Iz pripremljenog razrijeđenja 43x (42 μ l vode + 1 μ l 10 μ M dvolančanih oligonukleotida) uzeto je 1 μ l za reakciju uz 0,86 μ l pUK21gg vektora, 2 μ l 10x Buffer G (New England Biolabs, SAD), po 1 μ l 10 mM DTT i 10 mM ATP, 1 μ l *BbsI* (*BpiI*) (New England Biolabs, SAD), 1 μ l T4 DNA ligaze (Takara Bio, SAD) i 12,4 μ l vode. Napravljena je i kontrolna reakcija po istom protokolu, samo bez inserta. Reakcije su postavljene u PCR uređaj na 6 ciklusa; 5 min na 37°C te 5 min na 23°C.

Na kraju se radio tretman s enzimom RecBCD (New England Biolabs, SAD), kako bi se pocijepale sve linearne molekule DNA. Reakcija je uključivala 11 μ l produkta ligacijske reakcije, 1,5 μ l 10x Exonuclease V Buffer (New England Biolabs, SAD), 1,5 μ l 10 mM ATP, 1 μ l ExoV(RecBCD). Reakcija je postavljena na 37°C, 30 min.

U konačnici su transformirane kompetentne bakterije XL10-Gold prema već opisanom protokolu. Nakon oporavka, bakterijski alikvot je razmazan na kanamicinske LB ploče te su postavljene preko noći u inkubator. Pozitivni klonovi su selektirani *colony* PCR-om s početnicama pUX21_seqF i pUX21_seqR i setom *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) te su pripremljene prekonoćne kulture iz kojih su napravljeni glicerolski štokovi i izolirana plazmidna DNA prema protokolu *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD). Izolirani konstrukti pUK21gg-LC-NoINT su poslani na sekvenciranje sa univerzalnim početnicama (M13F i M13R) u MacroGen servis.

Odabrani ispravni klon pUK21gg-LC-NoINT spreman je kao gotovi modul za *Golden Gate Assembly* IgG-Dual-noInt, a za potrebe *Golden Gate Assembly* IgG-T2A-NoINT potrebno je prenijeti insert (laki lanac s uklonjenim intronom) u T2A-modul plazmid.

PCR-om je umnožen gen za laki lanac bez introna s plazmida pUK21gg. Korištena je polimeraza visoke točnosti *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent, SAD) i par početnica koje sadrže restriksijsko mjesto za enzime *NcoI* i *KasI*, LC-BsaI-2-NcoI-FW i LC-BsaI-2-KasI-RE (Tablica 1). PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2 min početne denaturacije na 95°C; 30 ciklusa od 20 s denaturacije na 95°C, 20 s prijanjanja početnica na 60°C i na 55°C, 1 min elongacije na 72°C; 3 min završne elongacije na 72°C. Naziv PCR produkta: LC_noINT (750 pb).

PCR produkt LC_noINT pročišćen je pomoću *QIAquick PCR Purification Kit (50)* (Qiagen, Njemačka), izmjerena je koncentracija na NanoVue uređaju te je napravljena digestija pročišćenog produkta s enzimom *BsaI* prema protokolu, s 300 ng DNA i u puferu 10x NEB Buffer Cut Smart (New England Biolabs, SAD). Reakcija je postavljena preko noći na 37°C nakon čega je uslijedila inaktivacija 20 min na 65°C. T2A-modul plazmid porezan je s restriksijskim enzimima *NcoI* i *KasI* (New England Biolabs, SAD). Ovakvim digestijama dobiveni su kompatibilni krajevi koji omogućuju ligaciju inserta LC_noINT i vektora, T2A-modul plazmida. Napravljena je ligacija porezanog T2A modula i LC_noINT u ukupnom volumenu od 20 μ l. Molarni omjer inserta i

vektora je 3:1. U reakciju je dodano 50 ng vektorske DNA. Reakcija je postavljena 1 sat na 22°C. Uslijedila je transformacija kemijski kompetentnih bakterija s 3 µl ligacijske smjese. Na LB-kanamicinske ploče je razmazano 100 µl alikvota bakterija.

Sutradan je napravljen *colony* PCR pomoću *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) i početnica pUX21_seqF i pUX21_seqR, te su odabrana dva pozitivna klonova T2A-modul-LC_noINT. Pripremljene su prekonoćne kulture tih klonova, iz kojih su napravljeni glicerolski štokovi i izolirana je plazmidna DNA pomoću seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača. Klonovi su poslani na provjeru sekvenciranjem u MacroGen servis.

3.2.1.2. Konstrukcija modula s genom za teški lanac imunoglobulina G

Za kloniranje teškog lanca unutar različitih modula potrebnih za ovaj eksperiment, naručen je sintetizirani gotovi dvolančani fragment DNA, tzv. *gBlock* (Integrated DNA Technologies, SAD) željene sekvence od 1499 pb, te je otopljen prema uputama proizvođača.

Priprema modula pH_C 1-f₃ s teškim lancem IgG-a za potrebe Assembly-ja IgG-T2A-Int i IgG-T2A-NoInt

Napravljena je digestija *gBlock*-a s enzimima *Pst*I i *Sac*I (New England Biolabs, SAD) u 20 µl reakcijske smjese. Dodano je 10 ng kalupa, 2 µl Neb Buffer 1.1, po 1 µl *Pst*I i *Sac*I (New England Biolabs, SAD) te vode do punog volumena. U drugoj PCR tubici je napravljena digestija *shuttle* vektora pUK21gg s 200 ng DNA kalupa te istim količinama pufera i enzima. Reakcije su postavljene na 37°C, 2 sata, nakon čega je uslijedila inaktivacija enzima 20 min na 80°C.

Nakon digestije napravljena je ligacija uz molarni omjer inserta i vektora 3:1 pUK21gg i teškog lanca IgG-a u 20 µl reakcijske smjese te je postavljena reakcija u PCR uređaj 1 sat na 22°C. Transformirane su bakterije XL10-Gold s 3 µl ligacijske smjese. Selektirani transformanti na kanamicinsku rezistenciju - sutradan su provjereni pomoću *colony* PCR-a na prisutnost inserta u pravilnoj orijentaciji, pomoću početnica FW_MB_IgG1_seq i pUX21_seqR (Tablica 1) te seta *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD). Ispravnost sekvence dobivenog konstrukta pH_C 1-f₃ (4101 pb) potvrđena je sekvenciranjem (MacroGen, Amsterdam, Nizozemska).

Priprema modula pHC_1-4 s teškim lancem IgG-a za potrebe Assembly-ja IgG-Dual-Int i IgG-Dual-noInt

Sekvenca teškog lanca IgG-a umnožena je PCR reakcijom polimerazom visoke točnosti *Herculase II Fusion DNA Polymerase* (Agilent, SAD) s parom početnica alt_Ig_PstI-tNS-1-FW i new_IgG_SacI-tNS-4-RE (Tablica 1) koje sadrže restrikcijska mjesta za *SacI* i *PstI* čime je dobiven PCR produkt IgG1-HC_1_4 (1460 pb) pogodan za daljnje manipulacije. Reakcija je postavljena prema pripadajućem protokolu u 50 µl reakcije. PCR se odvijao pri sljedećim uvjetima: 2 min početne denaturacije na 95°C; 30 ciklusa od 20 s denaturacije na 95°C, 20 s prijanjanja početnica na 60°C i na 55°C, 1 min elongacije na 72°C; 3 min završne elongacije na 72°C. PCR produkti su analizirani na 1%-tnom agaroznom gelu obojanom etidij-bromidom.

Napravljena je digestija pUK21gg i PCR produkta IgG1-HC_1_4 s restrikcijskim enzimima *SacI* i *PstI* (New England Biolabs, SAD) u NEBuffer 1.1 (New England Biolabs, SAD) prema protokolu. Reakcija je postavljena na 37°C, 16 sati te 80°C, 20 min. Uslijedila je defosforilacija porezanog vektora pomoću temperaturno osjetljive alkalne fosfataze *Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific, SAD) na 37°C, 20 min i inaktivacija enzima na 75°C, 5 min.

Napravljena je ligacijska smjesa porezanog i defosforiliranog vektora pUK21gg i PCR produkta IgG1-HC_1_4. Selektirani su pozitivni klonovi na LB-kanamicinskim pločama, napravljen je *colony* PCR pomoću seta *Emerald Amp MAX HS PCR Master Mix* (Takara Bio, SAD) i početnica FW_MB_IgG1_seq i pUX21_seqR (Tablica 1) te su pozitivni klonovi izolirani pomoću seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača. Klonovi su poslani na provjeru sekvenciranjem u Macrogen servis. Odabran je jedan klon pHC_1-4 ispravne sekvence i visoke koncentracije, koji će biti iskorišten za sklapanje finalnog konstrukta.

3.2.2. Golden Gate *Assembly*-ji plazmidne okosnice i konstruiranih modula s teškim i lakim lancima IgG-a te modula s promotorom i terminatorom za dobivanje finalnog konstrukta za ekspresiju IgG-a

3.2.2.1. *Assembly* IgG-T2A-int

Za T2A *assembly* spareni su oligonukleotidi Ig_B_dualS i IgG_dualA dužine 46 pb (Tablica 1). Oligonukleotidi su spareni i fosforilirani u 1 μ l 10x T4 Ligation Buffer s dodatkom 0,5 μ l T4 Polynucleotide Kinase (Takara Bio, SAD) i 6,5 μ l vode. Uvjeti reakcije su postavljeni na 37°C 30 min; na 95°C 5 min te postupno ohlađeni do 25°C.

Sklopljen je *assembly* od pet modula i plazmidne okosnice sa 20 ng vektora u molarnom omjeru vektora i inserta 3:1. Količine koje su dodane u reakciju su određene skaliranjem koncentracije inserta prema formuli $f(x) = [\text{duljina inserta (pb)}/\text{duljina vektora (pb)}] \times \text{koncentracija (ng}/\mu\text{l)}$. U reakciju je dodana plazmidna okosnica pBB-C1 (2533 pb) koja sadrži biljeg za rezistenciju na ampicilin *AmpR*, spareni oligonukleotidi (oligo-Ig_B_A-dual, 46 pb), modul s promotorom tNS-pPro-cBh (3909 pb), modul s terminatorom tNS-pTer-H (3299 pb), modul s teškim lancem IgG-a pHC_1-f3 (4101 pb) i gen za laki lanac IgG-a s intronom pLC-int-T2A (3908 pb), 10x Cut Smart Buffer (New England Biolabs, SAD), ATP (10mM), *BsaI* (New England Biolabs, SAD), T4 DNA Ligase (Takara Bio, SAD) i voda u ukupnom volumenu od 20 μ l. Reakcija se odvijala prema sljedećim uvjetima: 10 ciklusa od 10 min na 37°C i 10 min na 16°C; zatim inkubacija 5 min na 50°C, te inkubacija od 10 min na 80°C.

Po završetku ligacije, u tubice je dodana egzonukleaza RecBCD (New England Biolabs, SAD) i ATP (10 mM) te je reakcija postavljena na 37°C, 30 min kako bi se pocijepala preostala linerarna DNA i postpješila uspješnost transformacije kemijski kompetentnih bakterija.

Plazmidna okosnica pBB-C1 sadrži gen *lacZ* koji kodira za β -galaktozidazu. U prisustvu analoga laktoze IPTG-a i kromogenog supstrata X Gal-a, doći će do plavog obojenja kolonije ako je β -galaktozidaza aktivna. Sklapanjem *assembly*-ja, dolazi do ugradnje jednog od modula unutar *lacZ* mjesta pa neće nastati funkcionalna β -galaktozidaza. Kolonije koje sadrže finalni konstrukt neće biti plavo obojene jer ne mogu razgraditi X Gal u podlozi pa ostaju bijele. Stoga su klonovi selektirani na LB-ampicilinskim podlogama sa 100mM IPTG-om i X Gal-om (20 mg/ml), pomoću plavo-bijele selekcije. Na tako pripremljene podloge, razmazano je 100 μ l alikvota bakterija. Nakon

što su porasle bakterije napravljen je *colony* PCR s bijelim kolonijama u svrhu provjere pozitivnih klonova koji su dalje postavljeni u prekonocne kulture u LB medij s ampicilinom. Sutradan su pročišćeni bakterijski lizati uz pomoć seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača. Konstrukti su analizirani PCR-om i restrikcijom (*KasI* i *NcoI*) na 1%-tnom agaroznom gelu koji je obojan sa SYBR Safe DNA interkalirajućom bojom.

3.2.2.2. Assembly IgG-T2A-NoInt

Sklopljen je *assembly* od pet modula i plazmidne okosnice sa 20 ng vektora u molarnom omjeru vektora i inserta 3:1. Količine dodane u reakciju su određene na prethodno opisan način. U reakciju je dodana plazmidna okosnica pBB-Cl (2533 pb) koja sadrži biljeg za rezistenciju na ampicilin *AmpR*, spareni oligonukleotidi (oligo-Ig_B_A-dual, 46 pb), modul s promotorom tNS-pPro-cBh (3909 pb), modul s terminatorom tNS-pTer-H (3299 pb), modul s teškim lancem IgG-a pHC_1-f3 (4101 pb) i gen za laki lanac IgG-a bez introna pLC-NoInt-T2A (3702 pb), 10x Cut Smart Buffer (New England Biolabs, SAD), ATP (10mM), *BsaI* (New England Biolabs, SAD), T4 DNA Ligase (Takara Bio, SAD) i voda u ukupnom volumenu od 20 µl. Reakcija se odvijala prema već opisanom protokolu. Napravljeni su selekcija i pročišćavanje kao i kod *Assembly IgG-T2A-int*.

3.2.2.3. Assembly IgG-Dual-int

Dual assembly se radio u dva koraka. Cilj je bio napraviti dva finalna konstrukta koja se razlikuju u lakom lancu; jedan konstrukt bi sadržavao laki lanac bez introna (LC_noINT) a drugi laki lanac s intronom u kojem je mutirano *BsaI* mjesto (LC_INT_noBsaI).

U prvom koraku ovog *assembly*-ja korišteni su već pripremljeni spareni oligonukleotidi oligo-IgG_B-A_dual (46 pb) uz plazmidnu okosnicu pBB-Cl (2533 pb) s biljegom na ampicilinsku rezistenciju *AmpR*, promotor tNS-pPro-cBh (3909 pb), terminator tNS-pTer-H (3299 pb) te gen za teški lanac IgG-a pHC_1-4 (4084 pb). U reakciju je dodan 10x Cut Smart Buffer (New England Biolabs, SAD), ATP (10mM), *BsaI* (New England Biolabs, SAD), T4 DNA Ligase (Takara, SAD) i voda u ukupnom volumenu od 20 µl. Skalirana je koncentracija inserta kao i kod T2A *assembly*-ja. Uvjeti reakcije su također ponovljeni. Nakon ligacije je dodano u tubicu 2µl ATP-a (10mM) i 1µl enzima RecBCD (New England Biolabs, SAD). Takva smjesa je inkubirana na 37°C, 30 min.

Transformirane su bakterije, selektirane na *AmpR* te je napravljena analiza konstrukata *Assembly_Dual-STEP1* s *colony* PCR-om i restrikcijom (*XbaI*) prije drugog koraka.

Nakon prvog koraka, napravljen je i drugi korak *assembly*-ja. U pripremljenu tubicu je dodano 0,5 µl *Assembly_Dual-STEP1* (4681 pb) iz radne otopine 100 ng/µl uz 0,56 µl promotora tNS-pPro-cBh (3909 pb), 0,51 µl terminatora tNS-pTer-H (3299 pb), 0,99 µl pLC_INT_noBsaI (3545 pb), 10x Cut Smart Buffer (New England Biolabs, SAD), ATP (10mM), *BsaI* (New England Biolabs, SAD), *BsmBI* (Thermo Scientific, SAD), T4 DNA Ligase (Takara, SAD) i voda u ukupnom volumenu od 20 µl. Reakcija je postavljena u PCR uređaj pri sljedećim uvjetima: 10 ciklusa 37°C, 10 min i 16°C, 10 min; 50°C 5 min, 80°C 10 min. Nakon reakcije ligacije, dodano je u tubice po 2 µl ATP (10mM) i 1 µl egzonukleaze RecBCD (New England Biolabs, SAD). Reakcija je inkubirana na 37°C, 30 min. Napravljena je transformacija kemijski kompetentnih bakterija koje su razmazane na ampicilinskim pločama te su sutradan selektirane narasle kolonije pomoću *colony* PCR-a. Pozitivni klonovi su pročišćeni pomoć seta *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, SAD) i podvrgnuti su restrikciji kao metodi dodatne provjere.

3.2.2.4. Assembly IgG-Dual-noInt

Postavljen je *assembly* od tri modula i plazmidne okosnice sa 50 ng vektora u molarnom omjeru vektora i inserta 3:1. Količine dodane u reakciju su određene na prethodno opisan način. U reakciju je dodana plazmidna okosnica *Assembly_Dual-STEP1* (4681 pb) koja sadrži biljeg za rezistenciju na ampicilin *AmpR*, modul s promotorom tNS-pPro-cBh (3909 pb), modul s terminatorom tNS-pTer-H (3299 pb) i modul s laki lancem IgG-a bez introna pLC-NoInt (3339 pb), 10x Cut Smart Buffer (New England Biolabs, SAD), ATP (10mM), *BsaI* (New England Biolabs, SAD), *BsmBI* (New England Biolabs, SAD), T4 DNA Ligase (Takara Bio, SAD) i voda u ukupnom volumenu od 20 µl. Reakcija se odvijala prema već opisanom protokolu. Napravljeni su selekcija i pročišćavanje kao i kod *Assembly IgG-T2A-int*.

Tablica 1. Oligonukleotidi korišteni prilikom konstrukcije vektora.

Naziv	Sekvenca (5' - 3')	Primjena
Ig-PstI-tNS-1-FW	ATTTCTGCAGATGGTCTCTCCATGGCATGCC CTGGCTTCCTG	Umnažanje i restrikcijsko kloniranje lakog lanca IgG-a u <i>shuttle</i> vektor pUK21gg
corr-Igk-tNS-4-XhoI-RE	ATTTCTCGAGGTCTCTAGCGCCTCTAACACT CTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	
pUX21_seqR (M13R)	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG	Univerzalne početnice za sekvenciranje i <i>colony</i> PCR
pUX21_seqF (M13F)	GTAAAACGACGGCCAGT	
LC-BbsI_rm_Intron-S (65-mer)	TTTGGAGTCTTCCATTCACGTTCCGGCTCGGG GACCAAGCTCGAGATAAAAACGTACGGTGGC TGCA	Oligonukleotidi za hibridizaciju i uklanjanje introna unutar lakog lanca s <i>BsaI</i> mjestom
LC-BbsI_rm_Intron-A (65-mer)	ATGGTGCAGCCACCGTACGTTTTATCTCGAG CTTGGTCCCCGAGCCGAACGTGAATGGAAG ACTC	
alt_Ig_PstI.tNS-1-FW	ATTTCTGCAGGGTCTCTCCATGGCCTGTCCT GGATTCTG	
new_IgG-SacI-tNS-4-RE	ATTTGAGCTCGGTCTCAAGCGCTCACTTTCC TGGGCTAAGGGAGAGGG	PCR i <i>colony</i> PCR gBlock-a
HC_block-FW	CAACAGCGACTGCAGGGTCTC	
C9_seq2	ATCCTGACCTCCGCATCCC	
Fw_MB_IgG1_seq	CGGAGGGACTATACTTATGAAAAGG	<i>Colony</i> PCR teškog lanca IgG-a
BGH_rev_primer	CCTCGACTGTGCCTTCTA	ukloniranog u pUK21gg i <i>colony</i> PCR <i>assembly</i> -IgG-T2A
LC-BsaI-2-KasI-RE	TAATGGTACCGGTCTCTGCGCCCCTCTAACAC CTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	Umnažanje i restrikcija
LC-BsaI-2-NcoI-FW	GCGTCTGCAGATGGTCTCTCATGGCATGCC TGGCTTCCTGTGG	pLC-int-noBsaI
Ig_B-A_dual-S (46-mer)	TGACACCTGGAGACGGTTCGCTGTTGTGGGG TTCACGTCTCTTACC	Hibridizacija oligonukleotida za <i>Assembly_Dual-STEP1</i>
Ig_B-A_dual-A (46-mer)	TACCGGTAAGAGACGTGAACCCCGACAACA GCGACCGTCTCCAGGT	

3.2.3. Transfekcija

3.2.3.1. Održavanje stanica u kulturi

Alikvot suspenzijskih stanica HEK293 Freestyle izvađen je iz spremnika s tekućim dušikom i odmrznut kratkom inkubacijom u kupelji na 37°C, nakon čega je 1 ml odmrznute stanične suspenzije prenesen u 29 ml toplog hranjivog medija baz seruma 293 FreeStyle Expression Medium (Thermo Fischer Scientific, SAD). Stanice su uzgajane u konusnoj tikvici na 37°C u inkubatoru s 8%-tnim udjelom CO₂ u atmosferi na orbitalnoj tresilici s konstantnim miješanjem na 140 rpm. Napravljeno je pet pasaža prije transfekcije. Broj stanica u kulturi je svo vrijeme održavan na 0,2 x 10⁶ st/ml uklanjanjem dijela stanične suspenzije i dodavanjem svježeg medija.

3.2.3.2. Transfekcija stanica

Stanice HEK293 Freestyle raspoređene su na pločice za staničnu kulturu sa šest jažica (2x10⁶ st/jažici) i odmah transfecirane pomoću transfekcijskog reagensa 293-Fectin (Thermo Fischer Scientific, SAD) sa ukupno 2 µg DNA po jažici.

Prije transfekcije, stanice su prebrojane i određena im je vijabilnost pomoću Bürker-ove komorice i tripanskog modrila te je pripravljena stanična suspenzija koncentracije 1x10⁶ st/ml. U svaku jažicu je dodano po 2 ml pripravljene suspenzije.

Prema Vink i sur. (2013) određene su količine svakog pojedinačnog vektora za transfekciju. Za pojačanu ekspresiju plazmida s antitijelima potrebno je izvršiti istovremenu transfekciju s p33SVLT plazmidom, p21 i p27 u sljedećem masenom omjeru: 0,69/0,01/0,05/0,25 (plazmid s antitijelom/p33SVLT/pORF-hp21/pORF-hp27). Prema tome je određeno da po tranfekciji ide 1,4µg/20ng/100ng/500ng plazmida kako bi u konačnici bilo ukupno 2 µg DNA po transfekciji. Pripravljene su mješavine plazmida koje su sadržavale navedene konstrukte DNA prema izračunu, u Opti-MEM mediju (Thermo Fischer Scientific, SAD). Razrijeđeno je po 4 µl 293Fectin-a u 76 µl Opti-MEM-a, sve je promiješano i inkubirano 5 min. Mješavina 293-Fectin-a i Opti-MEM medija je dodana dokapavanjem u tubicu sa DNA (dok se vorteksirala). Uslijedila je inkubacija 20 min na sobnoj temperature te je dodana transfekcijska mješavina na stanice u jažicama. Dvije jažice su sadržavale UTF kao kontrolu. U tim jažicama su bile stanice i medij bez transfekcijske mješavine. Supernatant iz transfekcije HEK293 Freestyle konstruktima za ekspresiju teškog i lakog lanca IgG-

a skupljen je nakon tri i pet dana. Ukupni volume supernatanta od 2 ml skupljen je iz svake jažice, centrifugiran na 4 000 g, 5 min, nakon čega je prenesen u čistu tubicu i smrznut na -20°C do analize *dot blot* metodom.

3.2.4. Dot Blot

Dot blot je metoda za detekciju, analizu i identifikaciju proteina. Nalikuje *Western blot* metodi, a razlikuje ih to što se kod *Western* proteini separiraju elektroforetski a kod *dot blot*-a točkaju u kružnom obliku, direktno na membrani. Koncentracija proteina se može odrediti semikvantitativno pomoću specifičnog antitijela na pročišćeni protein uspoređujući uzorke sa standardima poznate koncentracije.

Korištenjem *dot blot* metode u ovom eksperimentu, provjereno je ima li IgG-a u supernatantima transfeciranih HEK293 Freestyle i približno je procijenjena količina izlučenog IgG-a.

Napravljena je shema (raspored) kapanja uzoraka na nitroceluloznu membranu (Amersham Protan, Njemačka). Membrana je položena u plastičnu posudicu i prekrivena je s 1xPBS-om koji je nakon namakanja membrane izliven, a membrana i posudica su osušeni papirom. Membrana je vraćena u plastičnu posudicu te su na nju nanešeni uzorci, kontrole i standardi (2x po 2μl). Dok se membrane sušila, pripremljen je svježi PBST (1:1000 razrijeđen detdžent Tween u 1xPBS). Pripremljeno je 5%-tno mlijeko u PBST-u; 1,25g praha Milchpulver (Carl Roth, Austrija) dodano je u 25 ml PBST-a. Membrana je blokirana 30 min prekrivanjem s pripremljenim mlijekom na tresilici, na 4°C. Napravljeno je 1:2000 razrjeđenje primarnog antitijela na ljudski Fc fragment IgG-a obilježeno peroksidazom iz hrena (*Ab97225, goat anti-human IgG-Fc, HRP, Abcam, UK*) u mlijeku te je takva smjesa dodana na membranu nakon završetka blokiranja s mlijekom. Posudica s membranom je prekriven aluminijskom folijom i inkubirana na tresilici 1 sat na 4°C. Nakon inkubacije razrijeđeno antitijelo je izliveno te je membrane kratko isprana dva puta sa svježim PBST-om a treći put je prelivena sa 30 ml PBST-a i inkubirana 45 min na tresilici, na 4°C.

Radi vizualizacije rezultata, napravljeno je razvijanje filma. Pomiješani su reagensi za detekciju (Sigma Aldrich, Švicarska) u omjeru 1:1 (500 μl Detection Reagent 1 + 500 μl Detection Reagent 2). S pripremljenom smjesom reagenasa, membrana je ravnomjerno prelijevana 2 min nakon čega je ocijeđena na papiru. Potom je umetnuta između dvije folije u kazetu.

Postupak je nastavljen u tamnoj komori uz crvenu lampu. Pažljivo su pripremljena dva komada fotografskog papira (GE Healthcare Limited, Velika Britanija) i položena su u kut kazete (točno iznad membrane). Kazeta je zatvorena 1 min, potom je izvađen fotografski papir i prenešen kroz seriju otopina; razvijач → destilirana voda → fiksir → ispiranje vodom. Nakon ispiranja pod mlazom vode, fotografski papir je dobro osušen u inkubator na 15 min.

4. REZULTATI

4.1. Konstrukcija sustava za proizvodnju imunoglobulina G

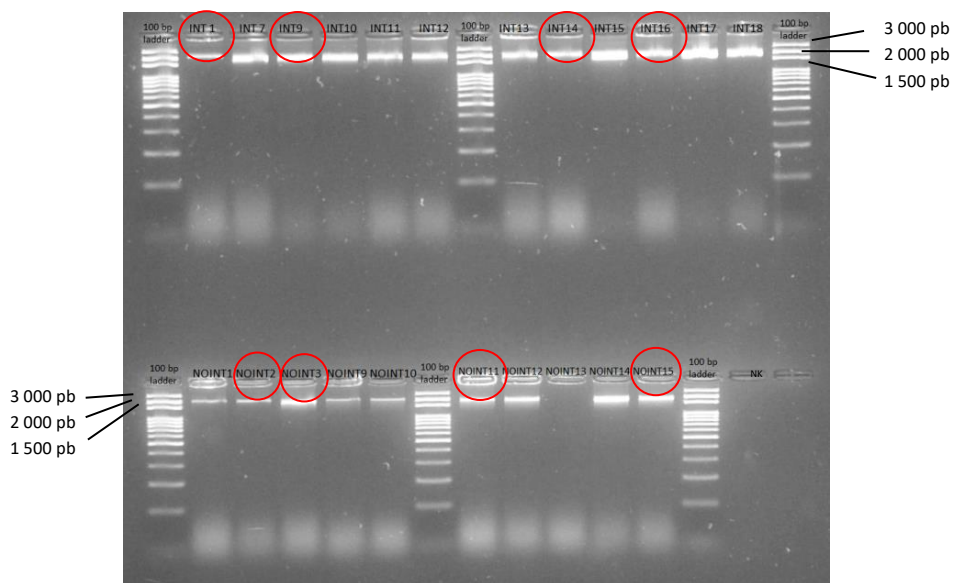
Prvi pristup, temeljen na bicistronskoj ekspresiji teškog i lakog lanca IgG-a povezanih samocijepajućim peptidom T2A uspješno je dizajniran (*Assembly* IgG-T2A). Drugi konstrukt s dvije ekspresijske kazete (za teški i laki lanac) pod zasebnim promotorima nije dobiven u okviru vremena predviđenog za izradu ovog rada (*Assembly* IgG-Dual). Cilj je bio u oba *assembly*-ja napraviti konstrukt s lakim lancem s intronom (u kojem je mutirano *BsaI* mjesto) i konstrukt s lakim lancem bez tog istog introna (Slika 5). Teški lanac je ostao isti u svim finalnim konstruktima.



Slika 5. Shema prikazuje plazmid pUK21gg-LC s naznačenim restrikcijska mjesta *BbsI* (*BpiI*) u kojemu se nalazi laki lanac IgG-a s intronom (isprekidana crta u svijetlo plavoj kazeti) i sparane oligonukleotide koji na krajevima sadrže *BbsI* (*BpiI*) mjesta. Nakon ugradnje oligonukleotida na mjesto introna dobiven je prikazani plazmid pUK21gg-LC-noInt (3339 pb).

Konstrukcija *assembly-IgG-T2A*

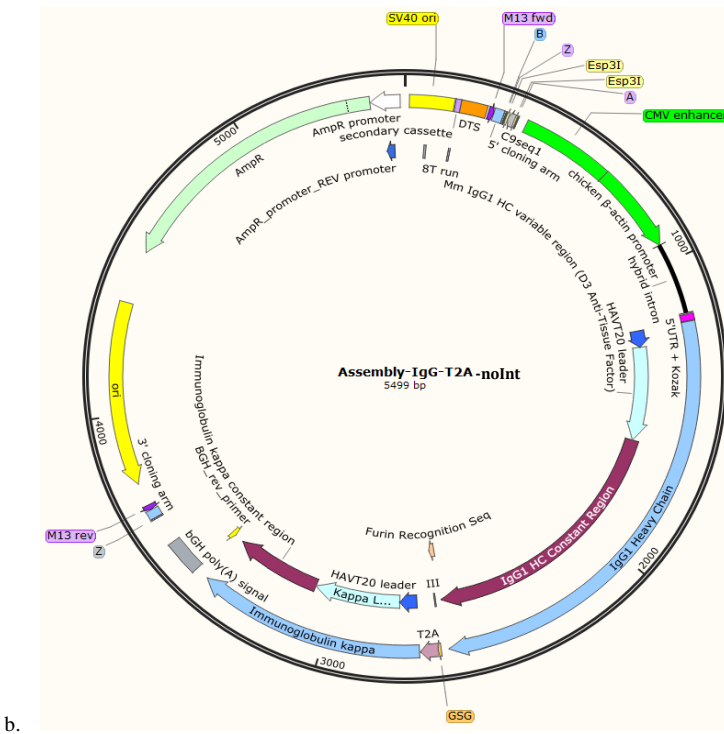
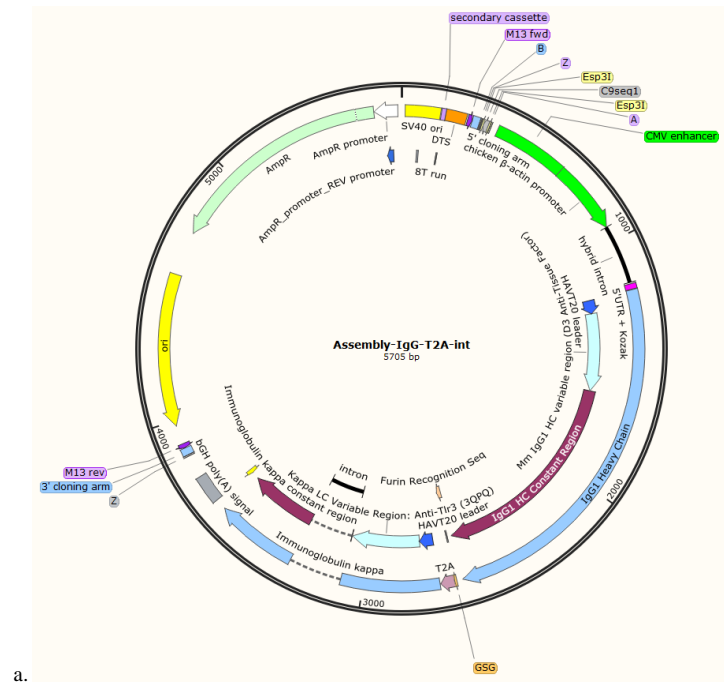
Nakon što su porasle kolonije na pločama, pomoću rezistencije na ampicilin i plavo-bijele selekcije odabrano je nekoliko klonova za *colony* PCR kako bi selektirali pozitivne klonove (Slika 6). Kod konstrukta s intronom očekivani fragment je 2114 pb, a kod konstrukta bez introna 1908 pb. Za provjeru konstrukcije *assembly*-ja digestijom odabrani su restriksijski enzimi *KasI* i *NcoI*. Pomoću *Snappene* programa utvrđeni su očekivani fragmenti na 1%-tnom agaroznom gelu. Nakon digestije *assembly-IgG-T2A-int* (5705 pb) sa odabranim enzimima na gelu bi trebali biti vidljivi fragmenti od 2744 pb, 1449 pb, 859 pb, 539 pb i dva od 57 pb, čime bi potvrdili uspješnost konstrukcije, dok bi digestijom *assembly-IgG-T2A-noInt* (5499 pb) trebali nastati fragmenti veličine 2744 pb, 1449 pb, 653 pb, 539 pb i dva od 57 pb. Fragmenti od 57 pb su iscurili iz gela, ali prisutnost ostalih fragmenata na gelu potvrdila je uspješno dizajnirane T2A *assembly*-je (Slika 7). Slika 8 prikazuje shemu finalnih T2A konstrukata. Odabrani su klonovi *assembly-IgG-T2A-int* i *assembly-IgG-T2A-noInt* ispravne sekvence i visoke koncentracije za transfekciju HEK293 Freestyle.



Slika 6. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata umnožene odabrane regije *assembly-IgG-T2A*. **100 bp ladder**-ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Estonija). **INT1-INT18**; odabrani bakterijski klonovi transformirani s konstruktom *assembly-IgG-T2A-int*, **NOINT1-15**; odabrani bakterijski klonovi transformirani s konstruktom *assembly-IgG-T2A-noInt*. **NK**-negativna kontrola. Klonovi zaokruženi crveno odabrani su za pročišćavanje plazmidne DNA i provjeru digestijom.



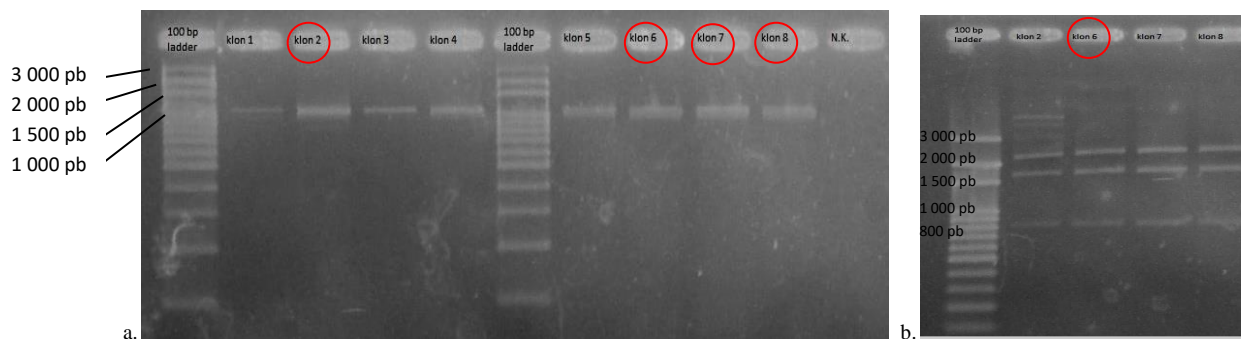
Slika 7. Provjera digestijom T2A *assembly*-ja s restriksijskim enzimima *NcoI* i *KasI*. **100 bp ladder** – ljestvičasti uzorak markera 100 bp DNA Ladder Ready to Load. **INT1-INT16**; pocijepane plazmidne DNA *assembly*-IgG-T2A-int. **MassRuler Mix** – ljestvičast uzorak markera MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific, SAD). **NOINT2-NOINT15**; pocijepane plazmidne DNA *assembly*-IgG-T2A-noInt. Zaokruženi uzorci su odabrani za transfekciju HEK293 Freestyle stanica.



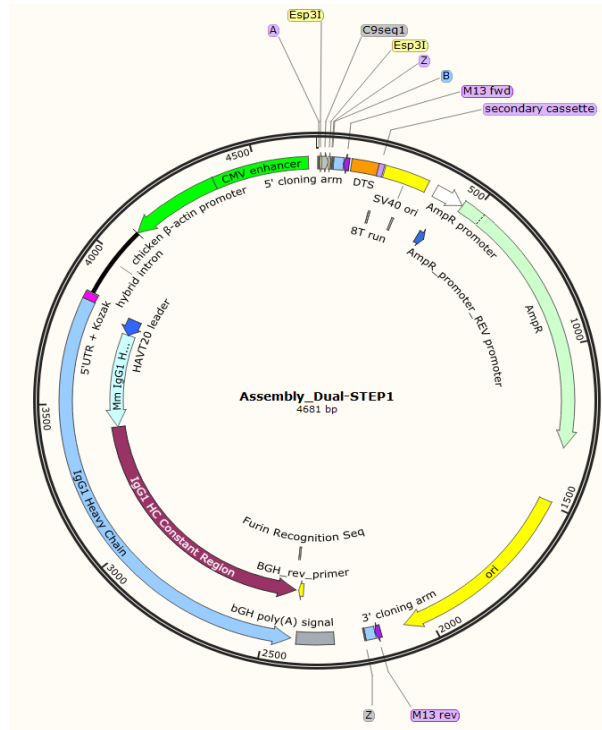
Slika 8. Struktura finalnog vektora *Assembly-IgG-T2A-int* (a) i *Assembly-IgG-T2A-noInt* (b). **Hibridizirani oligonukleotidi** (46 pb, od B do A), **CMV pojačivač** iz humanog citomegalo virusa, **promotor cBh**; hibridni oblik promotora beta-aktina kokoši, **IgG Heavy Chain**; gen za teški lanac IgG-a, **T2A**; samocijepajući peptid 2A iz kapsidnog proteina virusa *Thossea asigna*, **GSG**; aminokiselinski ostatci koji povećavaju efikasnost cijepanja na T2A i **Furin Recognition Seq** (furinsko cijepajuće mjesto), **IgG laki lanac** (od eng. *Immunoglobulin kappa*) **sa intronom s mutiranim BsaI mjesto** (a) i **IgG laki lanac bez introna** (b), **BGH poly (A) signal**; terminacijska sekvenca gena govedeg hormona rasta, **ORI** ishodište replikacije, **AmpR** rezistencija na ampicilin, **SV40 ori** ishodište replikacije velikog T antigena virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*).

Konstrukcija *assembly-IgG-dual*

U drugom pristupu se konstrukti razlikuju od prvog po tome što su teški i laki lanac pod zasebnim promotorima. Cilj je bio sintetizirati dva takva konstrukta koji se razlikuju u lakom lancu; jedan sadrži laki lanac s intronom u kojem je mutirano *BsaI* mjesto (*Assembly IgG-Dual-int*), a drugi sadrži laki lanac u kojem je taj isti intron izbačen i umjesto njega su ubačeni hibridizirani oligonukleotidi (*Assembly IgG-Dual-noInt*). Teški lanac je u oba konstrukta ostao isti. Također drugi pristup je rađen u dva koraka za razliku od *T2A-assembly*-ja koji je konstruiran u jednom koraku. Prvo je postavljena reakcijska smjesa samo s teškim lancem (pHC_1-4), promotorom CBh, terminatorom pTer, hibridiziranim oligonukleotidima i plazmidnom okosnicom pBB-Cl, čime je dobiven plazmidni konstrukt nazvan *assembly_Dual-STEP1* (4681 pb) (Slika 10). Nakon odabira pozitivnog klona pomoću *colony* PCR-a i provjere digestijom (Slika 9), određen je dobar klon s kojim se išlo u drugi korak *dual assembly*-ja.

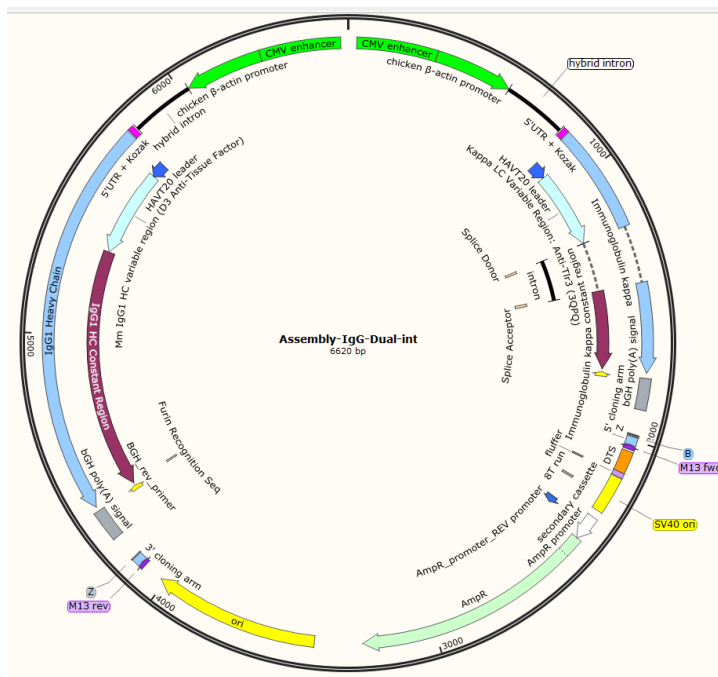


Slika 9. Rezultati provjere *Assembly_Dual-STEP1*(4681 pb). a. Agarozna gel elektroforeza umnoženog fragmenta prvog koraka *dual-assembly*-ja. Očekivani PCR produkt je 1090 pb. Zaokruženi klonovi su podvrgnuti pročišćavanju plazmidne DNA i provjeri digestijom (b) s enzimom *XbaI*. Očekivani fragmenti nakon digestije su: 2210 pb, 1654 pb i 817 pb. Zaokruženi uzorak je odabran za drugi korak *dual-assembly*-ja.

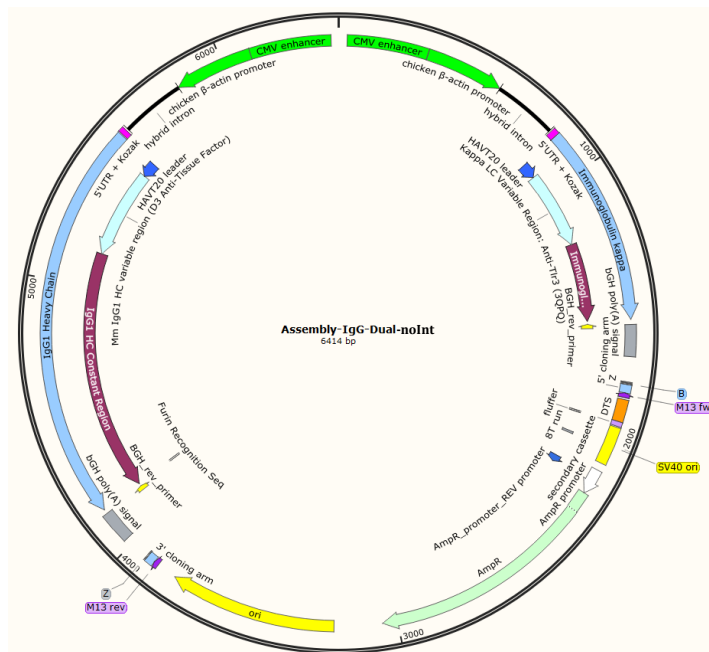


Slika 10. Shematski prikaz konstrukta Assembly_Dual-STEP1 (4681 pb). **Hibridizirani oligonukleotidi** (45 pb, od A do B), **SV40** (od eng. Simian virus 40), **CMV pojačivač** iz humanog citomegalo virusa, **promotor CBh**; hibridni oblik promotora beta-aktina kokoši, **IgG Heavy Chain**; gen za teški lanac IgG-a, **BGH poly (A) signal**; terminacijska sekvenca gena govedeg hormona rasta, **ori**; ishodište replikacije, **AmpR**; rezistencija na ampicilin (β -laktamaza), **Esp3I**; mjesto digestije restriksijskog enzima *Esp3I*(*BsmBI*), koje će biti korišteno u drugom koraku *dual assembly*-ja.

U drugom koraku *dual-assembly*-ja postavljene su dvije reakcije: jedna s Assembly_Dual-STEP1, pLC-INT (pUK21gg + laki lanac s mutiranim *BsaI* mjestom unutar introna), plazmidni vektor s promotorom CBh i plazmidni vektor s terminatorom (Slika 11a). Ovom reakcijom je trebao biti konstruiran *assembly-IgG-Dual-int* (6620 pb). Druga reakcija je postavljena s Assembly_Dual-STEP1, pUK21gg-LC-noInt (pUK21gg + laki lanac s izbačenim intronom koji je sadržavao *BsaI* mjesto), plazmidni vektor s promotorom CBh i plazmidni vektor s terminatorom za dobivanje *assembly-IgG-Dual* (Slika 11b). Napravljena je analiza i provjera, te nisu utvrđeni pozitivni rezultati za IgG-Dual *assembly*. Stoga s ovim konstruktima nisu transfecirane HEK293 Freestyle stanice.



a.



b.

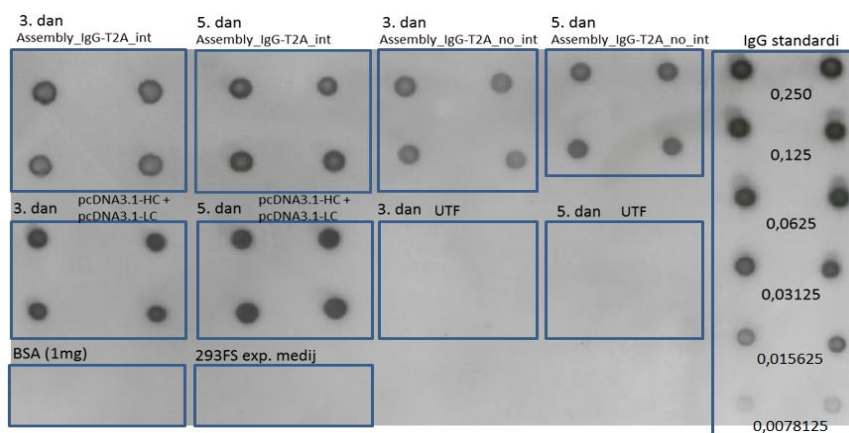
Slika 11. Struktura finalnih vektora *Assembly IgG-Dual-int* (a) i *Assembly IgG-Dual-noInt* (b). **CMV pojačivač** iz humanog citomegalo virusa, **promotor cBh**; hibridni oblik promotora beta-aktina kokoši, **IgG teški lanac** (eng. *IgG Heavy Chain*), **IgG laki lanac** (eng. *Immunoglobulin kappa*) **sa intronom s mutiranim *BsaI* mjesto** (a) i **IgG laki lanac bez introna** (b), **BGH poly (A) signal**; terminacijska sekvenca gena govedeg hormona rasta, **ORI** ishodište replikacije, **AmpR** rezistencija na ampicilin, **SV40 ori** ishodište replikacije velikog T antigena virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*).

4.2. Transfekcija HEK293 Freestyle i dot blot

Napravljena je transfekcija HEK293 Freestyle stanica s *assembly* IgG-T2A-int i *assembly* IgG-T2A-noInt. Dvije jažice su sadržavale negativnu kontrolu UTF. Stanice su skupljene treći i peti dan te su centrifugirane na 4000 g, 5 min. Stanični supernatant je prebačen u novu tubicu i zamrznut do *dot blot*-a. Za svaki konstrukt su napravljene biološke replike (A i B) za svaki dan skupljanja. Prema već opisanom protokolu napravljen je *dot blot*. Po 1 µl uzorka je nakapano na membranu prema prethodno određenoj shemi (Tablica 2). Kao pozitivna kontrola korišteni su stanični supernatanti u kojima je dokazana prisutnost IgG-a, a dobiven je kotransfekcijom teškog i lakog lanca na zasebnim plazmidima u stanice HEK293 Freestyle. Za negativnu kontrolu uzet je BSA (1 mg/ml), stanični supernatant netransfeciranih HEK293 Freestyle stanica (UTF) i svježi 293 Expression Medium koji je korišten za održavanje stanica. Standardi su razrijeđeni od početne koncentracije IgG-a 1 mg/ml (Slika 12).

IgG-T2A-int 3. dan	IgG-T2A-int 5. dan	IgG-T2A-noInt 3. dan	IgG-T2A-noInt 5. dan	Standardi (mg/ml)
X (A) X (B)	X (A) X (B)	X (A) X (B)	X (A) X (B)	X 0,250 X 0,250
X (A) X (B)	X (A) X (B)	X (A) X (B)	X (A) X (B)	X 0,125 X 0,125
3. dan	5. dan	3. dan	5. dan	X 0,0625 X 0,0625
+ (A) + (B)	+ (A) + (B)	UTF UTF	UTF UTF	X 0,3125 X 0,3125
+ (A) + (B)	+ (A) + (B)			X 0,015625 X 0,015625
BSA BSA	Exp.M. Exp.M.			X 0,0078125 X 0,0078125

a.



b.

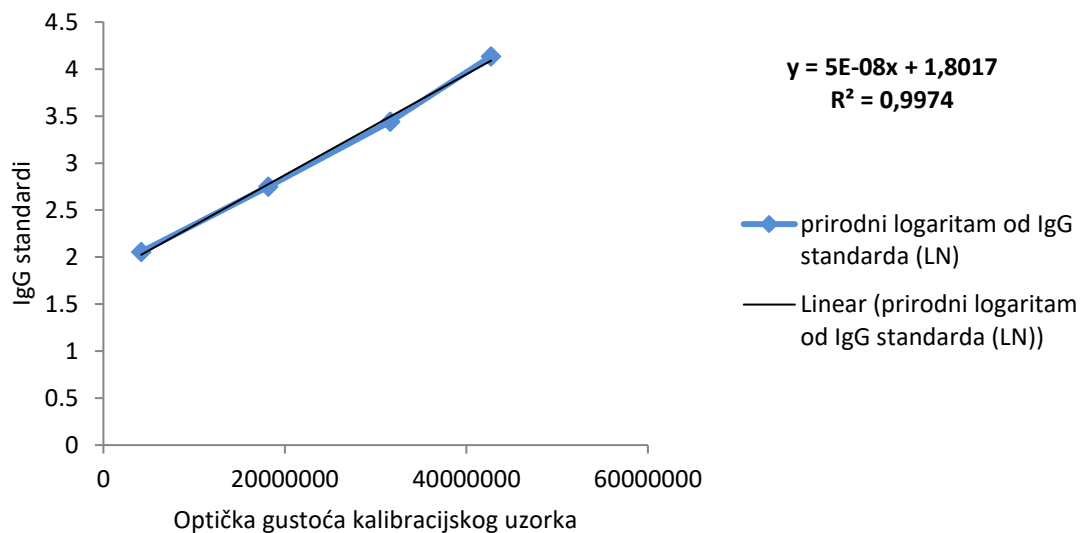
Slika 12. a) Raspored kapanja uzoraka na nitroceluloznu membranu (crveno - pozitivne kontrole, plavo - negativne kontrole). b) Prikaz *dot blot* membrane i redosljed nanosenih uzoraka, kontrola i standarda.

Korištenjem specifičnog antitijela na ljudski Fc fragment IgG-a, dokazana je prisutnost antitijela u staničnim supernatantima transfeciranih stanica (Slika 12). Rezultat *dot blot*-a je analiziran u programu ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) mjerenjem integrirane optičke gustoće točaka (OD) nakon automatskog uklanjanja pozadinskog signala. U Tablici 2. je prikaz određenih optičkih gustoća korištenih standarda.

Tablica 2. Prikaz vrijednosti izmjerenih optičkih gustoća točaka (OD) za pripremljene standarde.

IgG standardi [ng/μl]	Optička gustoća točaka
250,000	44833000
125,000	43607000
62,500	42711000
31,250	31591000
15,625	18153500
7,813	4166500

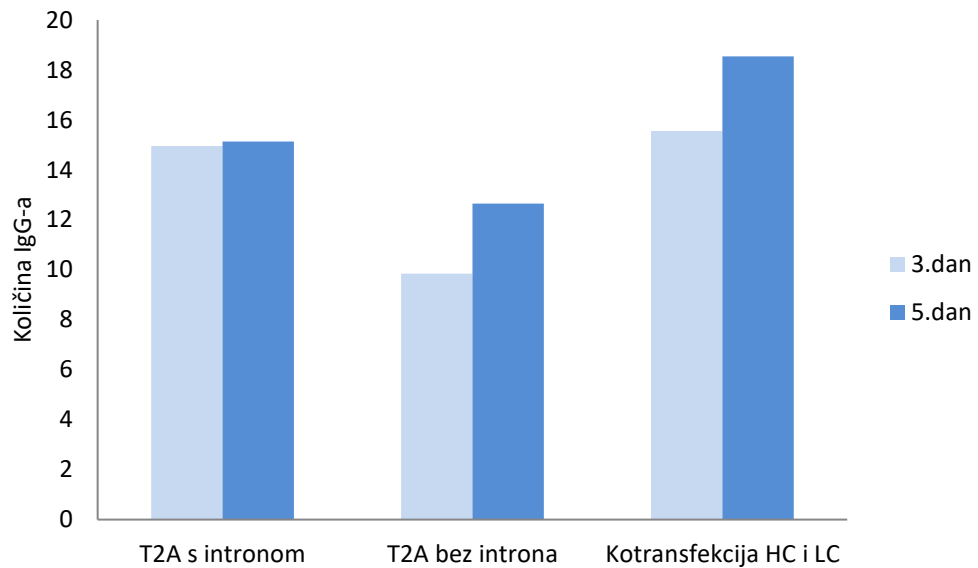
Napravljene su dvije tehničke replike za svaku biološku repliku te su uzete njihove srednje vrijednosti u svrhu mjerenja logaritamske količine IgG standarda u ovisnosti o optičkoj gustoći točaka (Slika 13). Linearnom regresijom ispitana je ovisnost te dvije veličine te je dobivena funkcija korištena za preračunavanje optičke gustoće uzoraka u količinu IgG proteina.



Uzorci	Optička gustoća uzorka	Aproksimacija količine IgG-a prema formuli ($y = 5E-08x + 1,8017$)
3. dan T2A_int	26299000	14,9512
3. dan T2A_nolnt	16093750	9,848575
3. dan kotransfekcija	27511750	15,557575
5. dan T2A_int	26659000	15,1312
5. dan T2A_nolnt	21684500	12,64395
5. dan kotransfekcija	33474250	18,538825

Slika 13. Prikaz ovisnosti logaritamske količine IgG standarda o izmjerenoj optičkoj gustoći (OD) kalibracijskih uzoraka. U svrhu aproksimacije i preračunavanja optičke gustoće uzorka u količinu IgG proteina, ovisnost te dvije veličine ispitana je linearnom regresijom. Primjećen je linearni trend uzoraka s nižim koncentracijama IgG standarda, odnosno u rasponu od 7,8 do 62,5 ng pa su oni analizirani. Postotak objašnjene varijance (R^2) za linearnu vrijednost iznosi 99,74 %.

Detekcijom IgG-a utvrđena je veća količina proteina peti dan nakon transfekcije u odnosu na treći dan. Konstrukt *assembly* IgG-T2A-int je dao veći intezitet IgG-a od *assembly* IgG-T2A-noInt. Pozitivne kontrole (kotrtransfekcija s lakim i teškim lancem) dale su najintezivniji signal u obje vremenske točke mjerenja (Slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz analize *dot blot* membrane. Kotransfekcija teškog i lakog lanca (HC i LC od eng. *heavy chain* i *light chain*) dala je intezivnije signale od *assembly* T2A.

5. RASPRAVA

HEK293 Freestyle su transfecirane konstruktima IgG-T2A i s tri dodatna plazmida – p33SVLT, pORF-hp21 i pORF-hp27. p33SVLT, tj. SVLT pojačava ekspresiju proteina na način da ima funkciju proteina pratitelja (eng. *chaperone protein*), inhibira mehanizam PERK i služi kao transaktivator CMV promotora (Moens i sur. 2001). Korištenjem inhibitora staničnog ciklusa, također se može pojačati ekspresija proteina u prolaznom ekspresijskom sustavu. U tu svrhu korištena je kombinacija p21 i p27 proteina. Njihova uloga je zaustaviti stanični ciklus u G2/M jer je to faza za optimalnu proizvodnju proteina (Vink i sur. 2013).

U našem eksperimentu je napravljena prolazna transfekcija koja je omogućila u kratkom vremenskom periodu proizvodnju IgG-a u dostatnoj količini za usporedbu efikasnosti proizvodnje. Iako se prolaznom transfekcijom može postići velika proizvodnja proteina, u industrijskoj proizvodnji se češće koristi stabilna transfekcija jer se dugoročno postižu veći prinosi (Ho i sur. 2013).

Nakon transfekcije HEK293 Freestyle stanica s *assembly* IgG-T2A-Int i *assembly* IgG-T2A-noInt, *dot blot* metodom je dokazano da stanice uspješno proizvode IgG. Detekcijom IgG-a potvrđen je uspješno dizajniran konstrukt te da se nastali poliprotein uspješno procesira zahvaljujući T2A samocijepajućem peptidu. Postavljanjem teškog i lakog lanca na jedan ekspresijski vektor postignuta je podjednaka ekspresija obje komponente imunoglobulina G. Ovaj pristup omogućava svakoj stanici, koja primi ovakav konstrukt da se svaka komponenta poliproteina (u ovom slučaju teški i laki lanac) ekspimiraju u jednakom omjeru. Na taj način je povećana efikasnost proizvodnje IgG-a. Vink i suradnici (2013) navode da razina ekspresije može varirati između različitih izotipova IgG-a, ovisno o tome kakvu varijabilnu regiju sadrže. Upotrebom ovakvih sustava mogu se proizvoditi antitijela za eksperimentalni razvoj novih glikoformi, za ispitivanje interakcija antitijela s efektorskim stanicama ili za proizvodnju antitijela s povećanom efektorskom funkcijom (Vink i sur. 2013). Stanice sisavaca su trenutno jako dobar sustav za proizvodnju velikih količina antitijela koja po biokemijskim svojstvima nalikuju ljudskim imunoglobulinima. Efikasnija proizvodnja postignuta je upotrebom različitih metoda genetičkog inženjerstva u stanicama sisavaca, pa tako i kod HEK293 Freestyle, čime je došlo do povećanja kvalitete i prinosa antitijela (Ho i sur. 2013).

Transfekcija HEK293 Freestyle s konstruktima *assembly* IgG-Dual nije napravljena jer nakon provjere digestijom nisu utvrđeni fragmenti koji bi potvrdili dobro dizajniran konstrukt. Smatra se da je glavni problem to što se radi o konstrukt s dva promotora i dva terminatora što je idealno za rekombinaciju unutar bakterija. Napravljeno je nekoliko optimizacija metode. Jedan od pristupa je bila transformacija kemijski kompetentnih bakterija *E. coli* NEB Stable s *assembly*-jem. Navedene bakterije imaju smanjenu aktivnost rekombinacijskog enzima *recA1* pa se preporučavaju za transformaciju i izolaciju plazmidne DNA koja sadrži ponavljajuće elemente (England Bio Labs, SAD). Unatoč tome, nisu dobiveni konstrukti *assembly* IgG-Dual-Int i *assembly* IgG-Dual-noInt.

Iako su naše analize ukazivale na dobro dizajniran *assembly_Dual-STEP1*, u konačnici smo pozitivne klonove navedenog konstrukta poslali na sekvenciranje čime su utvrđene brojne mutacije unutar plazmidne DNA u svim klonovima. Stoga predlažemo da se konstrukcija *assembly* IgG-Dual pokuša napraviti tako da se od samog početka rade kloniranja u kemijski kompetentnim stanicama *E. coli* NEB Stable kako bi se umanjila mogućnost rekombinacije.

U našem istraživanju dokazali smo da stanice transfecirane s *assembly* IgG-T2A-Int i *assembly* IgG-T2A-noInt uspješno proizvode IgG. U negativnim kontrolama nije detektiran IgG čime smo potvrdili da je korišteno antitijelo u *dot blot*-u visoke specifičnosti (izostao je signal na BSA), 293 Expression Medium nije bio kontaminiran IgG-om te da same stanice (netransfecirane) ne proizvode IgG (UTF kontrola). Rezultati pokazuju da je količina proteina veća peti dan nego treći dan i da je *assembly* IgG-T2A-Dual-Int dao veći intenzitet signala u odnosu na konstrukt bez introna, *assembly* IgG-T2A-noInt (Slika 14). U pozitivnim kontrolama je dokazana prisutnost IgG-a i one su dale najjači signal treći i peti dan. Takav rezultat se ne može prihvatiti sa sigurnošću s obzirom da bi transfekcija s jednim plazmidom trebala biti efikasnija u kontekstu proizvodnje IgG-a. Za procjenu količine izlučenog IgG-a po transfeciranoj stanici trebalo bi napraviti optimizaciju transfekcije HEK293 Freestyle stanica na način da se normalizira broj transfeciranih stanica. U našem pristupu to nije bilo moguće jer je potrebno uvesti dodatni marker za selekciju transfeciranih stanica, što se može napraviti uvođenjem kazete GFP reporter gena na isti vektor.

Lentivirusi se sve više koriste u istraživačkim laboratorijima i postaju snažan alat za dostavljanje gena u stanice sisavaca. Viralni RNA genom se reverzno transkribira i na taj način nastaje DNA koja se stabilno integrira u genom domaćina pomoću virusne integraze (prema:

Protocol for Lentiviral Transduction of Human Cells, Ibidi GmbH, Njemačka). Kod lentiviralne dostave najbitnija je proizvodnja po stabilnoj transfeciranoj liniji. Za selekciju stabilnih stanica, antibiotik (npr. puromicin) se dodaje u medij a fluorescencijskim signalom se mogu nadgledati stabilno transducirane stanice. Ovaj sustav je obećavajuć za 2A samocijepajuće peptide zbog normalizacije broja transfeciranih stanica pa se očekuje još bolji prinos IgG-a. Primjenom ovog pristupa, T2A sustav bi bio usporediv s kotransfekcijom čime bismo dobili relevantnije rezultate u ispitivanju količine izlučenog IgG-a.

6. ZAKLJUČAK

- Uspješno je konstruiran sustav za ekspresiju imunoglobulina G *assembly* IgG-T2A s intronom u lakom lancu u kojem je mutirano *Bsal* mjesto i s lakim lancem bez tog introna.
- *Assembly* za koekspresiju teškog i lakog lanca s jednog vektora (IgG-Dual) nije uspješno sintetiziran unutar vremenskog perioda predviđenog za izradu ovog diplomskog rada.
- Odabrani su konstrukti s ispravnom sekvencom *assembly* IgG-T2A-Int (s intronom u lakom lancu) i *assembly* IgG-T2A-noInt (bez introna u lakom lancu).
- Stanice HEK293 Freestyle su uspješno transfecirane dobivenim plazmidnim konstruktima.
- Skupljanjem staničnog supernatanta treći i peti dan, provjerena je ekspresija izlučenog IgG-a pomoću specifičnog antitijela za Fc fragment ljudskog IgG-a metodom *dot blot*.
- Analizom rezultata *dot blot*-a utvrđena je veća ekspresija IgG-a peti dan.
- Konstrukt s intronom (*assembly* IgG-T2A-int) pokazao je veći intenzitet signala IgG-a od konstrukta bez introna (*assembly* IgG-T2A-noInt). U supernatantima stanica, koje su bile kotransfecirane s lakim i teškim lancem, uočen je intenzivniji signal u odnosu na T2A *assembly*-je u obje vremenske točke mjerenja.
- Za usporedbu efikasnosti proizvodnje IgG-a po transfeciranoj stanici, što je bitno za planiranu primjenu lentiviralnom dostavom, potrebno je količinu izlučenog IgG-a normalizirati na broj transfeciranih stanica.
- Bicistronska ekspresija korištenjem samocijepajućeg peptida T2A pokazala se obećavajućim sustavom.

7. LITERATURA

1. Cooper G., Hausman E. R. (2009): Stanica: Molekularni pristup. Peto izdanje. Medicinska naklada, Zagreb 2010.
2. Dekkers G., Plomp R., Koeleman C. A. M., Visser R., von Horsten H. H., Sandig V., Rispens T., Wuhrer M., Vidarsson G. (2016): Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Scientific Reports* 6, Article number: 36964
3. Chng J., Wang T., Nian R., Lau A., Meng Hoi K., Ho CL H., Gagnon P., Bi X., Yang Y. (2015): Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *mAbs*; vol 7 – issue 2: 403-412
4. Vink T., Oudshoorn-Dickmann M., Roza M., Reitsma J. J., de Jong N. R. (2014): A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods* 65: 5-10
5. Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. (2014): IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol*; vol 5: 520
6. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA (2007): The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:21-50
7. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA. (1988): Glycobiology. *Annu. Rev. Biochem.* 57:785–838
8. Thomas G. (2002): Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Oct; 3(10): 753-766
9. Dicker M., Strasser R. (2015): Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015 Jul: Vol 15: 10
10. Griffin ME, Hsieh-Wilson LC. (2016): Glycan Engineering for Cell and Developmental Biology. *Cell Chem Biol.* 2016 Jan: 23(1): 108-121

11. Jostock T, Dragic Z, Fang J, Jooss K, Wilms B, Knopf HP. (2010): Combination of the 2A/furin technology with an animal component free cell line development platform process. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87:1517-24
12. Hans L.P. van Duijnhoven, Creemers JWM, Kranenborg MGC, Timmer EDJ, Groeneveld A, van den Ouweland AMW, Roebroek AJM, and van de Ven WJM. (2009): Development and Characterization of a Panel of Monoclonal Antibodies Against the Novel Subtilisin-Like Proprotein Processing Enzyme Furin. *Hybridoma*; 11(1): 71-86
13. Moens U, van Ghelue M, Kristoffersen AK, Johansen B, Rekvig OP, Degre M, Rollag H. (2001): Simian Virus 40 large T-antigen, but no Small T-antigen, Trans-activates the Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter. *Virus Genes* 23:2, 2015-226
14. Helenius AL, Aebi M. (2004): Roles of *N*-linked glyans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23: 115-145
15. Ohtsubo K, Marth JD (2006): Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855-867.
16. Ho SCL, Tong YW, Yang Y (2013): Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm. Bioprocess.* 1 (1), 71-87
17. Tian S, Huang Q, Fang Y, Wu J (2011): FurinDB: A Database of 20-Residue Furin Cleavage Site Motifs, Substrates and Their Associated Drugs. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 1060-1065
18. Fang J, Yi S, Simmons A, Tu GH, Nguyen M, Harding TC, VanRoey M, Jooss K (2007): An Antibody Delivery System for Regulated Expression of Therapeutic Levels of Monoclonal Antibodies *In Vivo*. *Mol. Ther.*, vol 15 no. 6, 1153-1159
19. dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp (01.09.2017.)
20. <https://www.neb.com/products/c3040-neb-stable-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information> (20.09.2017.)
21. https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN41_Protocol_for_lentiviral_transduction.pdf (29.09.2017.)

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Maria Bošković
Datum i mjesto rođenja: 28.02.1993, Split
Adresa prebivališta: Palih boraca 18, 21425 Selca, Hrvatska
Telefon: +385 99 599 8161
E-mail: mariaboskovic885@gmail.com

OBRAZOVANJE

rujan 2015.- sada Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Biološki odsjek, Diplomski studij molekularne biologije
rujan 2011.- rujan 2014. Sveučilište u Splitu, Odjel zdravstvenih studija
Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike
(Sveučilišni prvostupnik medicinsko laboratorijske dijagnostike)
rujan 2007. – rujan 2011. Zdravstvena škola Split, smjer farmaceutski tehničar

PROJEKTI

ožujak 2016. – listopad 2016. Diplomski rad na Zavodu za molekularnu biologiju,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
(Konstrukcija vektora za istovremenu ekspresiju teškog i lakog lanca imunoglobulina G u staničnoj liniji HEK293 Freestyle)

travanj 2014. – srpanj 2014.

Završni rad u Kliničkom bolničkom centru Split
Sveučilište u Splitu, Odjel zdravstvenih studija Split
(Pravilno izvođenje titra antitijela kod imuniziranih trudnica)

RADNO ISKUSTVO

studeni 2014. - kolovoz 2015.

Radno mjesto „Voditelj terenskog dijela istraživanja“ na projektu BBMRI-LPC – Biobanking and Biomolecular Research Infrastructure – Large Prospective Cohorts Hrvatski centar za globalno zdravlje, Sveučilišta u Splitu, Medicinskog fakulteta

ZNANJA I VJEŠTINE

Molekularne metode: osnovne molekularne metode (PCR, elektroforeza, izolacija DNA); metode genetičkog inženjerstva (restriksijska digestija, ligacija, kloniranje); stanična kultura (uzgoj stanica, transfekcija, selekcija)

Rad na računalu: korištenje alata MS Office, Adobe za dokumente i multimediju

Strani jezici: Engleski jezik: B razina