

Konstrukcija i testiranje vektora sa sekvencom za nestabilnu rekombinazu Cre

Skender, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:905440>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Barbara Skender
Konstrukcija i testiranje vektora sa sekvencom za nestabilnu rekombinazu Cre
Diplomski rad

Zagreb. 2015.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje razvoja i regeneracije mozga Centra za Regenerativne terapije Tehničkog Sveučilišta u Dresdenu, pod vodstvom dr. Heinera Grandela. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Ovim putem željela bih zahvaliti Prof. Michaelu Brandtu na pružanju mogućnosti izrade diplomskog rada u njegovoj istraživačkoj grupi.

Velika zahvala ide Dr. Heineru Grandelu koji je nadgledao moj istraživački rad te je uvijek bio spreman pomoći i odgovoriti na moja pitanja. Zahvaljujem i Michaeli Geffarth na pomoći i podršci kad god mi je trebalo.

Nadalje, zahvaljujem najboljim prijateljima Leu Č., Barbari G.. i Jacku D. na vjerovanju u mene.

Posebnu i najveću zahvalu upućujem izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na ukazanom povjerenju, pomoći i savjetima i vremenu izdvojenom za pronalazak odgovora na sva moja pitanja i nedoumice. Hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

KONSTRUKCIJA I TESTIRANJE VEKTORA SA SEKVENCOM ZA NESTABILNU REKOMBINAZU CRE

Barbara Skender
Rooseveltov trg 6,10 000 Zagreb, Hrvatska

Praćenje staničnih linija metoda je u embriologiji koja omogućava identifikaciju potomaka/progenitora nastalih diobom određene stanice tijekom embrionalnog razvoja. Metoda koja se često koristi pri genetičkom praćenju stanica upotreba je rekombinacijskog sustava Cre/loxP koji omogućava promjene ciljnog gena i unos biljega u stanicu. Rekombinaza Cre ima veliku aktivnost te njezinim unošenjem u stanice često dolazi do spontane aktivacije sustava Cre/loxP. Posljedica toga je otežano praćenje stanica od interesa. Regulacijom aktivnosti rekombinaze Cre povećala bi se specifičnost metode praćenja staničnih linija. Cilj ovog istraživanja bio je konstrukcija vektora koji kodira nestabilni oblik rekombinaze Cre koja bi, zbog specifične sekvence PEST, imala kratak polужivot, te analiza njezinih sposobnosti rekombinacije. Destabilizacija rekombinaze Cre postigla se ugradnjom sekvence PEST u vektor pCS2+ mCherry-T2A- Cre^{ERT2} putem ligacije. Fuzijski proteini kodirani ovim plazmidom imaju sposobnost aktivacije rekombinacije u ovisnosti o dodatku intuktora tamoksifena, kod optimalnih koncentracija. Različite koncentracije mRNA za destabiliziranu i stabilnu rekombinazu usporedno su se mikroinjicirale u jednostanične embrije riba zebrića (*Danio rerio*) da bi se našla optimalna koncentracija pri kojoj je sustav Cre/loxP inducibilan dodavanjem tamoksifena. Rezultati su pokazali pojavu rekombinacije inducirane tamoksifenom u embriju u koji je injektirana mRNA sa sekvencom za stabilnu rekombinazu Cre koncentracije 0,5 pg/μL. Nije uočena razlika u učinkovitosti rekombinacije između stabilne i destabilizirane rekombinaze Cre. Kako bi se potvrdili ovi rezultati, potrebno je provesti dodatna istraživanja u području rubnih koncentracija pri kojima se rekombinacija odvija (5 – 0,5pg /μL).

(31 stranica, 7 slika, 1 tablica, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: riba zebrića, PEST, Cre/loxP, tamoksifen, praćenje stanica

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

izv. prof. dr. sc. Vesna Benković

izv. prof. dr. sc. Jasna Hrenović

Rad prihvaćen: 18. veljače, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

CONSTRUCTION AND TESTING OF A VECTOR WITH A SEQUENCE FOR A NON – STABLE CRE RECOMBINASE

Barbara Skender
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The method of lineage tracing in embryology enables identification of cell's progeny during embryonic development. Method often used in genetic lineage tracing is the use of Cre/loxP recombination system which enables changes in the target gene and introduction of marker gene into the cell. Cre recombinase has high activity and its insertion into cells often leads to spontaneous activation. Consequently, cell tracking is hindered under these conditions. Restriction of activity of Cre recombinase would increase the specificity of the lineage tracing method. The aim of this study was the construction of a vector coding for non – stable Cre recombinase and analysis of its recombination ability. Destabilization of Cre recombinase would be achieved by ligation of PEST sequence, responsible for short half-life of proteins to Cre sequence in *pCS2+mCherry-T2A-Cre^{ERT2}* vector. Fusion proteins obtained from this vector have the ability to induce recombination in dependence on addition of tamoxifen, under optimal concentration. Different concentrations of mRNA for stable and destabilised recombinase were in parallel microinjected in one-cell zebrafish embryos (*Danio rerio*) to optimize concentrations under which Cre/loxP system is inducible by adding tamoxifen. Results shown the appearance of tamoxifen induced recombination in embryo injected with 0,5 pg/μL mRNA for a stable Cre recombinase. There was no difference in effectiveness of recombination between stable and a non - stable recombinase Cre. In order to confirm these results it is necessary to conduct additional testing border concentrations of Cre mRNA in which recombination is inducible (5 – 0,5pg/μl).

(31 page, 7 figures, 1 table, 35 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: zebrafish, PEST, Cre/loxP, Tamoxifen, lineage tracing

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Maja Matulić

Reviewers: Assoc. Prof. Dr. Maja Matulić

Assoc. Prof. Dr. Vesna Benković

Assoc. Prof. Dr. Jasna Hrenović

Thesis accepted: 18th February 2015.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	1
1. UVOD	2
1.1. Riba zebrica (Danio rerio)	2
1.1.1. Ekologija	2
1.1.2. Morfologija	2
1.1.3. Razmnožavanje i razvoj	4
1.2. Praćenje staničnih linija	5
1.2.1. Zeleni fluorescentni protein	6
1.2.2. Označavanje stanica putem genetičke rekombinacije	7
1.2.3. Rekombinacijski sustav Cre/loxP	7
1.3. Sekvenca PEST	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Materijali i metode korišteni za konstrukciju plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST	10
3.1.1. Lančana reakcija polimerazom	10
3.1.2. Priprema agaroznog gela	10
3.1.3. Elektroforeza	11
3.1.4. Izolacija produkta PCR iz agaroznog gela	11
3.1.5. Cijepanje restrikcijskom endonukleazom	11
3.1.6. Ligacija	12
3.1.7. Transformacija	12
3.1.8. Priprema i sekvenciranje DNA	13
3.1.9. Vizualizacija i stvaranje mape novodobivenog konstrukta	13
3.2. Materijali i metode korišteni za transkripciju mRNA	14
3.3. Materijali i metode korišteni za testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu	15
3.3.1. Transgenične linije i uzgoj riba zebrica	15
3.3.2. Priprema i parenje odraslih jedinki	15
3.3.3. Injektiranje mRNA konstrukata	16
3.3.4. Tretman toplinskim šokom i procjena fluorescencije embrija	17
3.3.5. Tretman embrija tamoksifenom	17
4. REZULTATI	18
4.1. Konstrukcija plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST	18
4.2. Testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu Cre	20
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	27
7. LITERATURA	28

1. UVOD

1.1. Riba zebrica (*Danio rerio*)

U zadnjih trideset godina nekolicina ribljih vrsta postale su modelni organizmi za raznovrsna znanstvena istraživanja. Među njima se po svojoj popularnosti ističe riba zebrica (*Danio rerio*). Iako je u početku bila korištena samo u istraživanjima vezanima za okolišni stres uzrokovan štetnim tvarima koje se nalaze u vodi (Laale 1977), u današnje vrijeme se zbog svojih karakteristika koristi i u mnogim drugim područjima kao što su npr. razvojna biologija, neurobiologija, genetika.

Nagli porast popularnosti upotrebe ribe zebrice kao modelnog organizma za genetička istraživanja dogodio se nakon što su George Streisinger i suradnici sa Sveučilišta u Oregonu ustanovili metode kojima se omogućila genetička manipulacija vrste (Streisinger i sur. 1981).

1.1.1. Ekologija

Riba zebrica tropska je slatkovodna riba iz porodice šarana (*Cyprinidae*) (www.fishbase.org). Njezino prirodno stanište prostire se kroz područje Indije, Bangladeša i Nepala, međutim, mogu se naći i u Pakistanu, Mianmaru i Šri Lanki (Spence i sur. 2008). Živi u rijekama, kanalima, barama i bazenima kraj potoka ili rižinih polja (Engeszer i sur. 2007).

1.1.2. Morfologija

Riba zebrica ime je dobila po horizontalnim linijama koje se protežu do analne peraje i sve do kaudalnih peraja na repu. Unutar pet naizmjeničnih crno – plavih pruga nalaze se dva tipa stanica sa pigmentom: melanofore i iridiofore. S druge strane, srebrnkasto – žute pruge sadrže ksantofore i iridiofore. Kao i ostale ribe bjelice, ribe zebrice imaju jednu dorzalnu peraju te im nedostaje adipozna peraja (Schilling 2002). Zbog manipulacije reprodukcijom, postoji više sojeva ove vrste, a to su zlatni, albino te sojevi s dugim perajama. Zlatni i albino sojevi su hipopigmentirani, te su na taj način fluorescentno obilježene molekule u ribici jasnije vidljivi (Whitfield 2002).

U laboratorijskim uvjetima težina ribe zebrice je između 0,5 – 0,9 grama, a ukupna duljina je 38 mm (Yossa i sur. 2011). Prosječni životni vijek ovih riba u

laboratorijskim uvjetima je tri i pol godine, iako mogu doživjeti čak pet i pol godina (Gerhard i sur. 2002).

Ribe zebrice pokazuju seksualni dimorfizam. Spolovi se razlikuju u veličini tijela, obliku i pigmentaciji. Mužjaci obično imaju manja i izduženija tijela sa zlatnim i plavim prugama te žućkastim obojenjem na analnoj peraji. U usporedbi s njima, tijela ženki su veća i okruglija te prekrivena srebrnim i plavim prugama s bijelim trbuhom (Slika 1). Osim toga, kod ženki postoji i mala genitalna papila ispred analne peraje (Parichy i sur. 2009). Ribe zebrice posjeduju svih pet osjetila: okus, opip, ravnotežu, miris, vid i sluh.



Slika 1. Morfološke razlike između mužjaka (lijevo) i ženke (desno) ribe zebrice. Slika je preuzeta sa:
http://erc.nd.edu/blogs/abeebe/files/2011/09/male_and_female_zebrafish.png.

1.1.3. Razmnožavanje i razvoj

U divljini ribe zebrice se razmnožavaju jednom godišnje, a sezona mriješćenja započinje u kolovozu, prije početka sezone monsuna (Talling i Lemoalle 1998). U laboratorijskim uvjetima mriješćenje se odvija tijekom cijele godine, obično svakih četiri do sedam dana (Clelland i Peng 2009). Ženka obično proizvede stotinjak jajašaca u jednom mriješćenju. Jajašca su prozirna, promjera 1,0 – 1,5 mm (Matthews i sur. 2002). Nakon polaganja jajašca ne postoji roditeljska briga za potomke.

Embrionalni razvoj riba zebrica je veoma brz: unutar prva 24 sata nakon oplodnje svi glavni organi su razvijeni, a već nakon tri dana ribe se izlegnu i počnu tražiti hranu. Nakon tri do četiri mjeseca ribe su seksualno zrele (Stern i Zon 2003).

Ustanovljeno je pet različitih razvojnih stadija ribe zebrice (Fleming 2007):

1. embrij : 0- 72 sata nakon oplodnje
2. rana ličinka: 72 sata – 13 dana nakon oplodnje
3. ličinka: 14 – 29 dana nakon oplodnje
4. mladunci: 30 dana – 3 do 4 mjeseca nakon oplodnje
5. odrasli: nakon postizanja spolne zrelosti

Zbog ekonomičnosti uzgoja, velikog broja potomaka, kratkog generacijskog vremena, vanjskog razvoja jajašaca te njihove prozirnosti i brzog embrionalnog razvoja, riba zebrica je iznimno pogodan modelni organizam, pogotovo za praćenje staničnih linija i procesa embriogeneze.

1.2. Praćenje staničnih linija

Praćenje staničnih linija metoda je u embriologiji koja omogućava identifikaciju potomaka/progenitora nastalih diobom određene stanice tijekom embrionalnog razvoja. Iako su početci ove metode još u 19. stoljeću, tek je u novije vrijeme praćenje staničnih linija postalo esencijalna metoda za proučavanje svojstava matičnih stanica. Obično se stanica označava biljegom koji se potom prenosi na njene potomke. Na taj način moguće je dobiti podatke o broju potomaka određene matične stanice, njihovoj lokaciji te stupnju diferencijacije (Kretzchmar i Watt 2012).

Glavno obilježje koje stanični biljeg mora imati je to da ne mijenja svojstva označene stanice, njezinih potomaka te susjednih stanica. Biljeg se mora prenositi s matične stanice isključivo na njezine potomke, ne bi smio nestati nakon nekog vremena, te se ne smije prenositi na susjedne stanice.

Danas se stanične linije prate na nekoliko načina. Jedan od načina je označavanje stanica vitalnim bojama. Ova metoda počela se primjenjivati početkom 20. stoljeća, a koristila se za direktno označavanje stanica i njihovih potomaka u embrijima vodozemaca tijekom gastrulacije (Vogt 1929). Stanice nekih embrija (npr. *Xenopus*) dovoljno su velike da se biljezi mogu u njih direktno injektirati. Neki od biljega kojima se tako mogu označiti stanice su hrenova peroksidaza ("*horseradish peroxidase*"- HRP) i bromodeoksiuridin (5- bromo-2'-deoksiuridin, BrdU). Prednost ove metode je u tome da se stanične linije mogu pratiti čak i kada se stanice ne vide direktno svjetlosnim mikroskopom. Glavno ograničenje praćenja stanica vitalnim bojama leži u tome da se biljeg razrijedi ili difundira nakon više ciklusa diobe stanica.

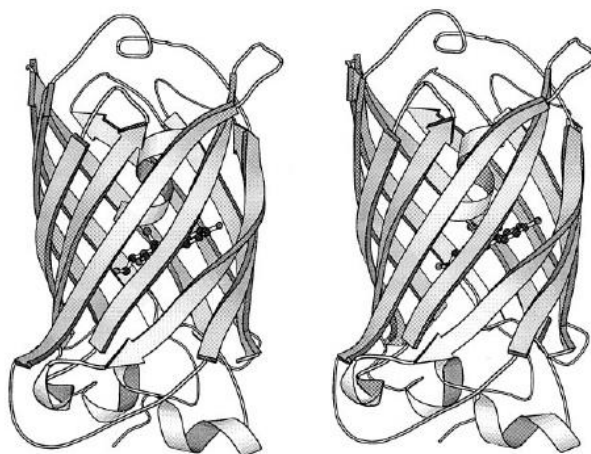
Upravo radi toga danas sve veću popularnost dobiva metoda genetičkog praćenja staničnih linija. Genetički markeri uključuju DNA sekvence koje kodiraju za fluorescentne proteine, npr. zeleni fluorescentni protein ("*green fluorescent protein*"- GFP) dobiven iz meduze *Aequorea victoria* (Chalfie i sur. 1994) ili gen za β -galaktozidazu bakterije *Escherichia coli* (kodiranu genom LacZ). Stanice se mogu označiti genetičkim markerima injekcijom, transfekcijom ili virusnom infekcijom.

Prednost genetičkog praćenja staničnih linija leži u činjenici da se genetički marker ne širi na susjedne stanice, ne razrjeđuje se tijekom vremena, već se, ukoliko je njegova ekspresija stabilna, trajno prenosi na stanice potomke.

1.2.1. Zeleni fluorescentni protein

Zeleni fluorescentni protein (*green fluorescent protein*, GFP) otkrili su Shimomura i sur. (1962) kao prateći protein akveorinu – kemiluminiscentnom proteinu koji se nalazi u meduzi *Aequorea victoria*. Zbog lako uočljive zelene fluorescencije čija indukcija ne zahtijeva niti jedan supstrat ili kofaktor, GFP se koristi, ne samo za istraživanja ekspresije gena i lokalizacije proteina, već i za detekciju živih stanica (Tsien 1998).

GFP je jednolančani protein koji se sastoji od 238 aminokiselina (Prasher i sur. 1992) od kojih većina formira β -bačvu. α -heliks koji sadrži kromofor nalazi se unutar bačve koja služi kao zaštita od vanjskih uvjeta (Li i sur. 1998) (Slika 2).



Slika 2. Trodimenzionalni prikaz strukture proteina GFP. 11 β – ploča formira β – bačvu unutar koje se nalazi α -heliks koji sadrži kromofor. Slika pripada S. J. Reningtonu, Sveučilište u Oregonu (Tsien 1998).

Proteini GFP koji sadrže fenolne anione postali su jedna od najkorištenijih grupa proteina u istraživanjima unutar stanične biologije (Tsien 1998). Pojačani zeleni fluorescencijski protein (*enhanced green fluorescent protein* – EGFP) pripada toj grupi proteina.

EGFP, za razliku od GFP-a, sadrži (Tsien 1998):

- optimalnu sekvencu za inicijaciju translacije, uključujući inserciju novog kodona CTG
- mutaciju Phe64 aminokiseline u Leu da bi se poboljšalo smatanje pri 37°C
- mutaciju Ser65 u Thr da bi se poboljšala ionizacija kromofore

- mutaciju His231 u Leu koja se najvjerojatnije dogodila spontano i nema nikakvu ulogu

Stabilna struktura proteina GFP ograničava njegovu primjenu u nekim istraživanjima, kao, na primjer, u istraživanjima indukcije transkripcije (Li i sur. 1998).

1.2.2. Označavanje stanica putem genetičke rekombinacije

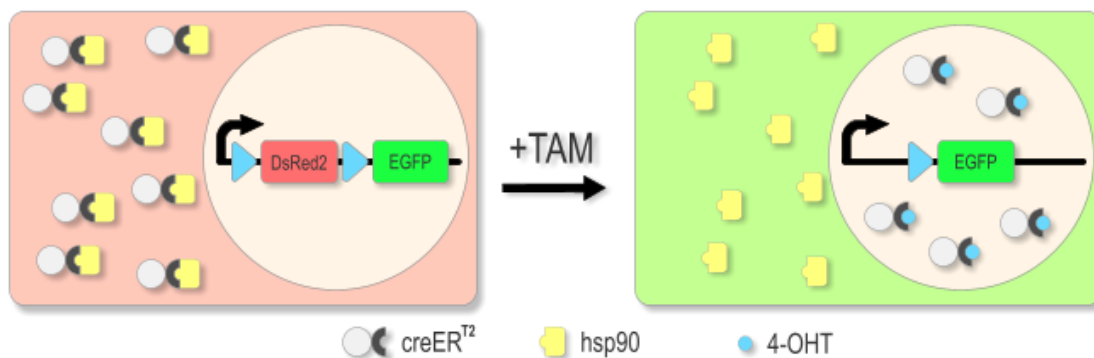
Genetička rekombinacija koristi se za praćenje staničnih linija od ranih 90-ih godina prošlog stoljeća. Enzim rekombinaza se eksprimira u specifičnoj liniji stanica ili tkivu s ciljem indukcije rekombinacije koja vodi ekspresiji reporterskog gena. Specifično rekombinirani reporterski se gen diobom prenosi na stanice potomke te se tako postiže trajno genetičko označavanje svih progenitora označene stanice.

1.2.3. Rekombinacijski sustav Cre/loxP

Rekombinacijski sustav Cre/loxP se tek od nedavno primjenjuje u riba zebrica. Rekombinaza Cre enzim je bakteriofaga P1 koji djeluje na točno određeno mjesto u genomu, a pripada skupini integraza. To je protein veličine 38 kDa, a katalizira rekombinaciju između dviju susjednih regija Loxp (Hamilton i Abremski 1984). Rekombinazu kodira gen *cre* (*cyclization recombination gene*). Gen *cre* ima mogućnost vezanja za različite promotore koji mogu biti vezani za određeno tkivo ili tip stanice. Na taj način se modifikacija gena može unijeti u točno određenom vremenskom periodu ili staničnom tipu.

Regija LoxP (*Locus of crossover in P1*) sastoji se od 34 parova baza: 8 parova baza pripada središnjoj regiji dok se na rubovima nalaze dvije palindromske sekvence od 13 parova baza.

Da bi se omogućila kontrola aktivnosti rekombinaze Cre unesene u stanicu, obično se koristi fuzijski protein sastavljen od sekvence rekombinaze i ljudskog estrogenog receptora (CreER). U nedostatku liganda, rekombinaza Cre ostaje u citoplazmi. Nakon indukcije tamoksifenom koji služi kao steroidni ligand receptora, receptor mijenja konformaciju i protein CreER potom odlazi u jezgru gdje Cre izvrši rekombinaciju regija loxP (Feil i sur. 1997) (Slika 4). Ponekad, ukoliko je koncentracija rekombinaze Cre u citoplazmi velika, može doći do spontanog prelaska rekombinaze u jezgru te samim time i do spontane rekombinacije (Hans i sur. 2009), bez dodatne indukcije ligandom.



Slika 3. Slikovni prikaz rekombinacije ovisne o rekombinazi Cre, regulirane ligandom u stanici reporterske linije riba zebrica "red-to-green". Dodani tamoksifen se pretvara u aktivni ligand 4-OHT, te se CreER^{T2} prebacuje u jezgru gdje katalizira rekombinacijski događaj TAM: tamoksifen, creER^{T2}: rekombinaza Cre fuzionirana s estrogenskim receptorom, hsp90: *heat shock protein 90*, 4-OHT: (Hans i sur. 2009).

Za uspješno stvaranje sustava Cre/loxP prvo je potrebno uzgojiti roditeljske linije, jedne u koju je unesen gen za rekombinazu Cre i druge koja sadrži sekvencu gena od interesa omeđenu sekvencama loxp, te biljeg koji se može pratiti. Njihovim križanjem nastaju jedinke koje sadržavaju obje sekvence i kod kojih se može inducirati mutacija DNA rekombinacijom, indukcijom rekombinaze Cre.

1.3. Sekvenca PEST

Sekvenca PEST je polipeptidna sekvenca bogata aminokiselinama prolinom (P), glutamatskom kiselinom (E), serinom (S) i treoninom (T). Nalazi se u proteinima koji imaju kratko vrijeme poluraspada, kao što su metabolički enzimi, transkripcijski faktori, određeni ciklini itd. (Rechsteiner i Rogers 1996). Poznato je da je mišja ornitin dekarboksilaza (MODC) jedan od proteina s najbržim vremenom poluraspada u stanicama sisavaca – 30 minuta. Na C kraju ovog proteina nalazi se sekvenca PEST (Slika 3). Delecija te sekvence usporava brzu degradaciju proteina (Ghoda i sur. 1989).

Sekvenca PEST služi kao signal za proteinsku degradaciju, te smanjuje vrijeme poluživota proteina. Fuzionirana s proteinom GFP, sekvenca PEST reducira njegov poluživot s 23 na 2 sata u stanicama sisavaca (Li i sur. 1998). Istraživanja su pokazala da tu istu ulogu vrši i kod fuzijskih proteina u transgeničnim ribama zebriticama (Ninov i sur. 2012).

M S C A Q E S G M D R H H G F P P R V E E Q D D G T L P
atg tct tgt gcc cag gag agc ggg atg gac cgt cac cat ggc ttc ccg ccg gag gta gag gag cag gat gat ggc acg ctg ccc

Slika 4. Sekvenca PEST dobivena iz mišje ornitin dekarboksilaze (Lecrerc i sur. 2000).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je konstrukcija i testiranje plazmida sa sekvencom za nestabilnu rekombinazu Cre.

S obzirom da se rekombinaza u sustavima Cre-LoxP nalazi pod promotorom aktiviranim samo u fazi S, do rekombinacije bi trebalo doći samo u proliferirajućim stanicama. Međutim, poluživot zelenog fluorescentnog proteina pod istim promotorom, eksprimiran s plazmida, pokazuje da protein opstaje i nakon što stanica izađe iz ciklusa. Pretpostavka je da i ekspresija rekombinaze Cre pod istim promotorom u plazmidu također ostaje nakon prestanka proliferacije.

Ovakav biljeg nije pogodan za praćenje i razlikovanje stanica koje su u ciklusu od onih mirujućih što je bitno, npr. kod praćenja matičnih stanica. Skraćivanjem poluživota rekombinaze omogućila bi se veća osjetljivost metode. Rekombinaza bi bila eksprimirana samo u kratkom vremenskom periodu, te bi bila ovisna o proliferaciji stanica. Stoga je potrebno naći idealnu koncentraciju rekombinaze Cre pri kojoj se ona inducira isključivo dodatkom liganda (tamoksifena).

Koraci kojima bi se došlo do cilja ovog istraživanja mogu se podijeliti na tri dijela:

1. konstrukcija plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST kako bi se usporedilo da li postoji razlika u koncentraciji liganda potrebnog za indukciju u odnosu na stabilnu rekombinazu Cre
2. transkripcija mRNA stabilne i nestabilne rekombinaze (Cre i Cre-PEST), *in vitro*, s odgovarajućih plazmida
3. testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu mikroinjiciranjem u oplođene jajne stanice ribe zebrice *Tg(hsp:loxpDsRedstoploxpEGFP)*, *in vivo*

3. MATERIJALI I METODE

Radi veće preglednosti ovo poglavlje podijeljeno je na tri dijela: Materijali i metode korišteni za konstrukciju plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST, Materijali i metode korišteni za transkripciju mRNA stabilne i nestabilne rekombinaze (Cre i Cre-PEST) *in vitro* s odgovarajućih plazmida, te Materijali i metode korišteni za testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu.

3.1. Materijali i metode korišteni za konstrukciju plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST

3.1.1. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (Polymerase Chain Reaction – PCR) reakcija je koja omogućava umnažanje ciljna sekvence DNA. Reakcijska je smjesa sadržavala je: 1.5 µL dNTP (10 mM), 0.5 µL DNA polimeraze *Phusion High Fidelity* (Thermo Scientific, 2 Units), 5 µL 5x pufera *Phusion High Fidelity* (Thermo Scientific), 1 µL MgCl₂ (100 mM), 1 µL početnice 5'-AGGTGGAGGAGCAGGATGAT-3' (10 mM), 1 µL početnice 3'-ATCATCCTGCTCCTCCACCT-5' (10 mM), 1 µL DNA predloška, te dH₂O do 50 µL. Pripremljena reakcijska smjesa stavljena je u uređaj za PCR gdje se umnožavanje odvijalo u 30 ciklusa. Opći uvjeti u kojima su se odvijali ciklusi su: denaturacija 94°C, 3 min, 30x ciklusi: 94°C 30 sec, 63°C 30 sec, 72°C 2 min, završno produljenje 60°C, 5 min. Konačni produkt provjeren je razdvajanjem na agaroznom gelu.

3.1.2. Priprema agaroznog gela

Za pripremu agaroznog gela potreban je pufer TAE, agaroz, kadica za elektroforezu. 50x TAE pufer sadrži 242 g Tris-a, 57.1 ml ledene octene kiseline, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0, te H₂O do 1 L. Koncentrirani TAE pufer razrijedi se u omjeru 1: 50. 1% agarozni gel pripremi se na način da se 1 g agaroze otopi u 100 mL 1x TAE pufera. Staklena tikvica sa smjesom stavi se u mikrovalnu pećnicu gdje se odvija otapanje agaroze. Nakon što se smjesa otopi i ohladi potrebno je dodati etidij bromid (0,5 uL/mL), te lagano promiješati. Etidij bromid je mutagen, stoga je prilikom njegovog

dodavanja potreban izniman oprez i nošenje zaštitnih rukavica. Smjesa se potom izlije u kadicu za elektroforezu, te nakon otprilike pola sata (kada smjesa polimerizira), agarozni gel je spreman za upotrebu.

3.1.3. Elektroforeza

Polimerizirani agarozni gel stavi se u kadicu za elektroforezu. U svaku jažicu u gelu unese se 3 μL uzorka pomiješanog s bojom (2 μL PCR produkta + 1 μL bromfenol plave boje otopljene u 30% glicerolu). Elektroforeza se odvija 20 minuta pri naponu od 40 mV. Po završetku, agarozni gel se analizira pod UV svjetlom u UV uređaju (UVITec). Preporučuje se što kraće izlaganje gela UV svjetlu da bi se spriječilo potencijalno oštećenje uzorka.

3.1.4. Izolacija produkta PCR iz agaroznog gela

Dobiveni produkt izoliran je nakon elektroforeze s agaroznog gela pomoću kompleta Nucleospin® Gela i PCR *Clean-up* (Macherey - Nagel). DNA fragment izreže se iz gela, izvaže, te otopi u puferu NTI (30 - 60% guanidijev klorid), 5 min na 60°C. Za svakih 100 mg agaroznog gela doda se 200 μL pufera NTI.

Uzorak se stavi u kolonicu NucleoSpin® i centrifugira 30 sekundi pri 11 000 x g. Ispiranje silika membrane vrši se dodavanjem 700 μL pufera NT3 u koji je prethodno dodan 100% etanol (80 mL etanola na 20 mL koncentriranog pufera). Po dodavanju pufera NT3 kolona se centrifugira prvo 30 sekundi pri 11 000 g , a zatim još jednom 1 min. da se uklone svi ostaci tekućine. Nakon premještanja kolone u novu epruvetu od 1.5 mL, doda se 15 μL elucijskog pufera NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) te se smjesa ostavi inkubirati 1 minutu na sobnoj temperaturi. Smjesa se potom ponovno centrifugira (1 min; 11 000x g) i sakupljena otopina s DNA pohrani se na -20°C.

3.1.5. Cijepanje restrikcijskom endonukleazom

Da bi se DNA pocijepala odgovarajućim restrikcijskim enzimom postavi se reakcija: 15 μL DNA pomiješa se s 5 μL 10 x pufera za restrikcijski enzim (1x Tango Buffer: 33 mM Tris-acetat (pH 7.9 na 37°C), 10 mM magnezijev acetat, 66 mM kalijev acetat, 0.1 mg/mL albumina dobivenog iz goveđeg seruma (*bovine serum albumin*; BSA); Thermo Scientific), 28 μL dH₂O i 2 μL enzima NheI (10 U/ μL) (Fast Digest Enzymes, Thermo Scientific).

Digestijska smjesa se inkubira 20 minuta pri 37°C. Pocijepana DNA razdvoji se elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Izrezana vrpca DNA se izolira pomoću kompleta agaroznog gela pomoću kompleta *Nucleospin® Gel i PCR Clean-up* (Macherey – Nagel).

3.1.6. Ligacija

Povezivanje sekvenci DNA odvija se u reakciji ligacije. Umnoženu sekvencu ugradilo se u vektor pCR blunt TOPO putem reakcije TOPO® Cloning reaction. Reakcijska smjesa sadrži: DNA predložak (2 µL), vektor pCR™II-Blunt-TOPO® (1 µL), 10 x pufera za ligaciju (1 µL) (10x pufer ima sastav: 300 mM Tris-HCl (pH=7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT i 10 mM ATP), 1 µL T4 DNA ligaze te 5 µL vode. 10 µL pCR TOPO vektora sadrži 10 ng/µL plazmidne DNA u puferu sastava: 50% glicerolu, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 µg/mL BSA, 30 µM bromfenol plave boje. Smjesa se potom ostavi na inkubaciji pri sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon toga produkt se transformacijom unese u bakterije.

Zatim je potrebno izvesti ligaciju putem koje se umnožena DNA sekvenca iz vektora pCR blunt TOPO ugradila u željeni plazmid (pCS2+ mCherry-T2A-Cre^{ERT2}). U smjesu inserta i vektora dodaju se 2 µL T4 DNA ligaze (350 U/ µL Takara) te 1x pufer za ligaciju. Omjer količina inserta i vektora u smjesi je 1:1 (1 µL inserta na 1 µL vektora). 10 x ligacijski pufer sadrži 300 mM Tris-HCl (pH=7.8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT i 10 mM ATP. Smjesa se inkubira 1 sat pri temperaturi od 16°C.

3.1.7. Transformacija

Transformacijom se unosi strana DNA u kompetentne bakterije. Kompetentne bakterije *E. coli* čuvaju se pri -80°C, te ih je prije same transformacije potrebno staviti na led 20 minuta kako bi se odmrznule. U 50 µL bakterijskih stanica doda se 4 µL ligacijske smjese. Toplinski šok odvija se u vodenoj kupelji (42°C, 45 sekundi). Nakon toplinskog šoka potrebno je inkubirati bakterije 2 minute na ledu. Po završetku inkubacije dodaje se 250 µL LB medija, te se smjesa ostavi na inkubaciji uz trešenje 30 minuta na temperaturi od 37°C.

Po završetku inkubacije 50 µL bakterija se pipetom nasadi na LB agar (20 mL) obogaćen ampicilinom (100 µg/mL) te se inkubiraju preko noći na 37°C da bi narasle kolonije.

3.1.8. Priprema i sekvenciranje DNA

Plazmidi iz bakterija izoliraju se pripreve pomoću kompleta *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep*). Odabrane bakterijske kolonije uspješno uzgojene na LB agaru obogaćenom ampicilinom pakupe se tipsom za mikropipete te se inokuliraju u LB medij. LB medij sadrži tripton 10 g/L, ekstrakt kvasca (5 g/L) te NaCl (5 g/L). Plazmidi uzgojeni u bakterijama izoliraju se pomoću kompleta *GeneJET Plasmid Miniprep* iz prekonoćnih kultura uzgojenih u mediju LB i inkubiranih na 37°C.

Jedan i pol mL bakterijskih kultura iz medija LB resuspendira se u 250 µL resuspenzijske otopine (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50% glicerol) u koju je dodana RNAza A (10 mg/ml, dobivena iz gušterače goveda; Thermo Scientific). Potom se doda 250 µL otopine za lizu te se, nakon okretanja tubice nekoliko puta, doda 350 µL otopine za neutralizaciju (25-50% gvanin klorid). Cijela smjesa potom se centrifugira (5 min; 11 000x g) da bi se istaložili ostaci bakterijskih stanica ili kromosomalne DNA. Supernatant se potom prenese u kolonicu *GeneJet* te se nakon centrifugiranja (1 min; 11 000x g) dodaje 500 µL otopine za ispiranje (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% izopropanol) u koju je prethodno dodan 96%-tni etanol (35 mL etanola na 25 mL koncentrirane otopine). Postupak se ponovi i na kraju se dodaje 50 µL elucijskog pufera (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) u tubicu koja se potom inkubira 2 minute na sobnoj temperaturi. Nakon završnog centrifugiranja (2 min; 11 000x g), sakupe se otopine plazmida i pohrane na -20°C.

Da bi se potvrdila uspješnost kreiranih konstrukata, oni su poslani na sekvenciranje u ustanovu za sekvenciranje koja se nalazi na Max Planck Institutu za molekularnu staničnu biologiju i genetiku (MPI-CBG). Analiza uspješnih klonova odvija se sekvenciranjem DNA dobivene iz bakterija.

3.1.9. Vizualizacija i stvaranje mape novodobivenog konstrukta

Za stvaranje i grafičko prikazivanje novokreiranog konstrukta PEST-Cre, korišten je *software ApE (A Plasmid Editor)* za Windows 98/ME/XP/2000.

3.2. Materijali i metode korišteni za transkripciju mRNA

Sintezu mRNA iz plazmida Cre- PEST i Cre izvela je Michaela Geffarth, tehničarka u istraživačkoj grupi prof. Michaela Brandta u Centru za regenerativne terapije TU Dresden. Za sintezu je korišten komplet *Ambion Message Machine*.

Svi reagensi osim 10 x reakcijskog pufera prvo se postave na led. 10 x reakcijski pufer se otapa na sobnoj temperaturi. Potom se pripremi reakcijska smjesa koja sadrži: 0.1-1 µL linearnog DNA predloška (PEST- Cre i Cre), 2 µL 10 x reakcijskog pufera (20 mM Tris-HCl, 12 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 0.16 mM β-NAD, 0.19 mM dNTPs), 10 µL 2x NTP/CAP (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP, 2 mM GTP, 8 mM analog Cap-a), 2 µL smjese enzima (puferirani 50% glicerol koji sadrži RNA polimerazu, inhibitor RNaze i ostale komponente), te vode bez nukleaza do 20 µL. Nakon što se epruveta sa smjesom lagano pomiješa pipetom, stavi se na inkubaciju 1- 2 sata pri temperaturi od 37°C. Po završetku inkubacije u doda se 1 µL Turbo DNAza (2U/ µL) te se smjesa inkubira dodatnih 15 minuta na istoj temperaturi da se ukloni DNA kalupa.

Reakcija se potom očisti kompletom *Ambion MEGAClear™*. Koraci uključuju dodavanje otopine za eluiranje u RNA uzorak do 100 µL. Potom se u smjesu dodaje 350 µL koncentrirane otopine za vezivanje, te 250 µL 100% etanola. Nakon centrifugiranja (30 sek; 11 000 x g) epruveta u kojoj se centrifugirala ispire se dva puta s 500 µL otopine za ispiranje (u koju je prethodno dodan 100% etanol; 20 mL etanola na 5 mL otopine). Potom se ponovno doda 50 µL otopine za eluiranje, a zatim se smjesa tretira toplinom (5 min, 70°C). RNA se dobije ponovnim centrifugiranjem (1 min; 11 000x g). Da bi se dobila što veća količina RNA, potrebno je ponoviti korak eluiranja.

3.3. Materijali i metode korišteni za testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu

3.3.1. Transgenične linije i uzgoj riba zebrica

Ribe zebrice su uzgajane u akvarijima na temperaturi od 28.5°C pri 24 - satnom ciklusu koji se sastojao od 14 sati svjetlosti i 10 sati mraka. Embriji riba zebrica dobiveni su prirodnim mriješćenjem odraslih jedinki. Nakon oplodnje čuvani su u mediju E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄ i 10⁻⁵ % metilen plave boje (Sigma – Aldrich)) u inkubatoru pri 28°C. Za testiranje rekombinacijske učinkovitosti konstruiranih plazmida korištena je transgenična linija *Tg(hspl:loxPDsRedstoploxPEGFP)* (Kroehne i sur. 2011). Linija je križana s dva divlja tipa ribe zebrice TL i WIK. Pod utjecajem promotora topliskog šoka ova transgenična linija eksprimira protein DsRed.

3.3.2. Priprema i parenje odraslih jedinki

Popodne prije samog procesa jedinke se moraju pripremiti za parenje. Potrebno je pripremiti deset spremnika za parenje napunjenih akvarijskom vodom. Spremnici su akrilne kutije zapremnine 1L (Semadeni, Switzerland). Svaki spremnik sadržava dva manja plastična spremnika Tupperware, jedan unutar drugog. Dno manjih spremnika zamijenjeno je mrežom rupica 2 mm od nehrđajućeg čelika. Ovi spremnici imaju ulogu sita: oplođena jajašca prolaze kroz rupice te na taj način se sprječavaju odrasle jedinke riba u jedenju jajašca. U donji spremnik se stavi mužjak ribe zebrice, dok se ženka nalazi u gornjem. Nakon stavljanja riba, spremnici se pokrivaju plastičnim poklopcem kako bi se izbjeglo iskakanje riba. Tako pripremljene ribe ostavljaju se preko noći. Spremnici moraju biti pažljivo označeni genotipom roditelja te brojem akvarija iz kojeg su jedinke uzete. Sat vremena nakon paljenja svijetla, ženka ribe zebrice se prebaci u spremnik u kojem je mužjak. Otprilike pola sata nakon prebacivanja ženke dolazi do oplodnje te ženka otpušta jajašca koja prolaze kroz rupice na mreži. Nakon oplodnje roditelji se prebacuju u drugi spremnik, a voda sa oplođenim embrijima procjeđuje se kroz plastičnu cjediljku. Embriji koji su ostali u cjediljki istresu se u Petrijeve posude napunjene medijem E3. Plastičnom pipetom se uklone eventualna neoplođena jajašca. Svako leglo mora biti pažljivo označeno.

3.3.3. Injektiranje mRNA konstrukata

Zbog toga što se u embrije u jednostaničnom ciklusu odvojeno injektiraju dvije različite mRNA, potrebno je pripremiti dva mikroskopa te priključiti dvije staklene igle za injektiranje na pneumatsku pumpu. Embriji iz jednog legla podijele se na tri dijela: u jedan dio injektira mRNA sa sekvencom za stabilnu rekombinazu, u drugi dio mRNA sa sekvencom za nestabilnu rekombinazu dok treći dio služi kao kontrola.

Pripremi se mikroskop stavljanjem staklene igle za injektiranje na pneumatsku pumpu (PV820 Pneumatic PicoPump). Staklena igla za injekcije pripremi se izvlačenjem staklene kapilare vanjskog promjera 0.1 mm na uređaju za izvlačenje mikropipeta. Od jedne kapilare dobiju se dvije igle.

Staklena igla napuni se s 2.14 μ L mRNA pomoću mikropipete. Zatim se stavi na pneumatsku pumpu te se vrh igle dovede u vidno polje na mikroskopu (Olympus SZX 10) i uroni u mineralno ulje. Mineralno ulje je potrebno za kalibraciju igle i određivanje volumena koji će biti injektiran. Pritiskanjem pedale priključene na pneumatsku pumpu, sadržaj iz igle injektira se u mineralno ulje. Promjer oslobođene kapljice treba biti 0.1 mm (500 pL mRNA). Nakon uspješno izvršene kalibracije igle na mikroskopu embriji se poslože uz rub predmetnog stakalaca. Ovako naslagani embriji stabilniji su te je lakše izvršiti precizno injektiranje.

Injektiranje mRNA mora biti u stanicu, a ne u žumanjak embrija. Kao što je već navedeno, mRNA se iz igle otpušta u stanicu pritiskom na pedal. Mikromanipulatorom se može prilagoditi položaj i udaljenost igle u odnosu na embrij.

mRNA se treba injicirati u embrij u jednostaničnoj fazi koja traje manje od sat vremena nakon oplodnje, stoga postupak injektiranja mora biti brz i učinkovit.

Injektirani embriji prebacuju se u nove, označene Petrijeve posudice napunjene medijem E3 te se stave na u inkubator na 28°C.

3.3.4. Tretman toplinskim šokom i procjena fluorescencije embrija

Da bi se inducirala ekspresija fluorescentnih proteina pod promotorom ovisnim o proteinima toplinskog šoka ribe su tretirane toplinskim šokom 24 sata nakon oplodnje. Medij E3, prethodno zagrijan na 42°C doda se u Petrijeve posude koje sadrže injektirane embrije. Potom se ti embriji inkubiraju na 38°C tijekom 2 sata. Nakon inkubacije embriji se vraćaju ponovno na 28°C.

Pojava fluorescencijskih proteina prati se pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus MVX10 Fluorescence Microscope) otprilike šest sati nakon tretmana toplinskim šokom.

3.3.5. Tretman embrija tamoksifenom

Fuzijski protein CreER sadrži sekvencu za rekombinazu fuzioniranu sa sekvencom estrogenskog receptora. Tretmanom tamoksifenom, koji oponaša estrogen, omogućuje se njegovo vezanje za receptor na fuzijskom proteinu i njegov unos u jezgru. Tamoksifen (TAM; Sigma, 50 mM) se doda pipetom u Petrijevu posudu u kojoj se nalaze embriji u E3 mediju (5 µL/50 mL E3). Otprilike tri sata nakon dodavanja tamoksifena, pojava fluorescencijskih proteina, kao odgovor na indukciju, prati se pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus MVX10 Fluorescence Microscope).

4. REZULTATI

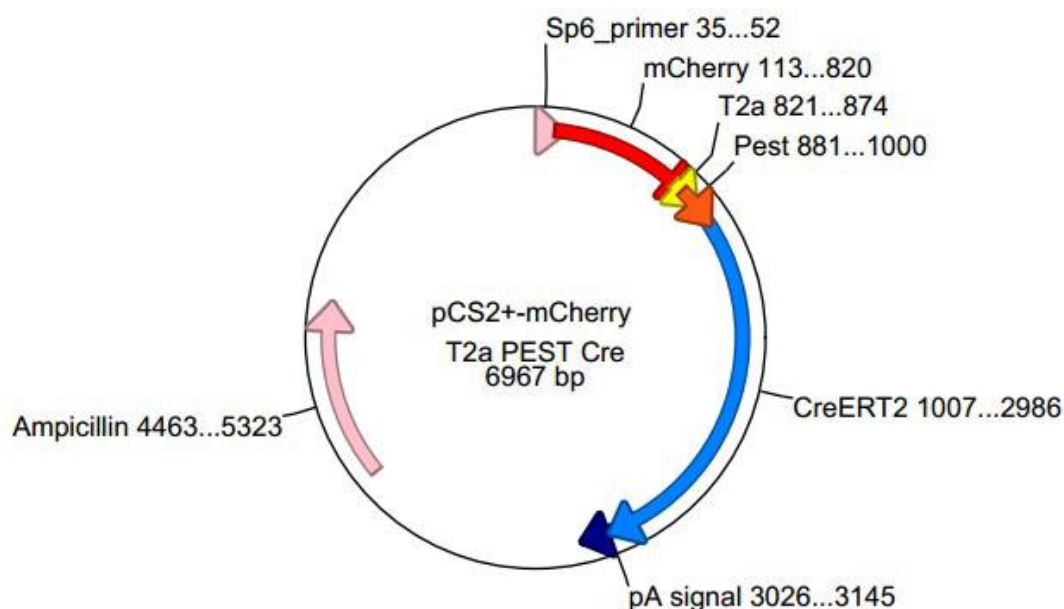
Eksperimentalni dio ovog istraživanja odvio se na sljedeći način: konstruiran je vektor sa sekvencom za rekombinazu Cre fuzionirane sa sekvencom PEST koja bi trebala skratiti polужivot rekombinaze Cre. Konstruirani vektor testirao se mikroinjiciranjem mRNA dobivenih transkripcijom cDNA rekombinaze divljeg tipa i fuzijske rekombinaze sa sekvencom PEST u jednostanične embrije riba zebrica. Embriji su se potom inducirali toplinskim šokom kako bi se našla optimalna koncentracija pri kojoj se rekombinacija Cre/loxP odvija uz prisutnost liganda (tamoksifena), a ne spontano. Tretman toplinskim šokom potreban je stoga što transgenična linija riba zebrica *Tg(hsp:loxPDsRedstoploxPEGFP)* koja se koristila u ovom istraživanju eksprimira protein DsRed pod utjecajem promotora toplinskog šoka. To je ujedno i dokaz uspješnog injektiranja mRNA rekombinaze. Ukoliko je koncentracija injektirane mRNA dovoljno velika da se rekombinacija odvije spontano, embriji nakon tretmana toplinskim šokom ekspimiraju GFP što se manifestira kao pojava zelene fluorescencije pod fluorescencijskim mikroskopom.

4.1. Konstrukcija plazmida sa sekvencom Cre fuzioniranom sa sekvencom PEST

Umnožavanje sekvence PEST postiglo se lančanom reakcijom polimerazom (PCR), prema sekvenci PEST na plazmidu pT2KXIGΔin (Ninov i sur, 2012). Umnožena sekvenca potom se ugradila u plazmid pCR blunt TOPO. Zatim se sekvenca PEST iz njega izrezala pomoću restrikcijskog enzima (NheI). Istovremeno je plazmid pCS2+ mCherry-T2A-Cre^{ERT2} sa sekvencom Cre pocijepan istim restrikcijskim enzimom (NheI), te je odsječak sa sekvencom PEST ugrađen u plazmid od interesa (pCS2+ mCherry-T2A-Cre^{ERT2}). Da bi se izbjegle steričke smetnje s C-terminalno smještenim estrogenskim receptorom u fuzioniranom plazmidu, sekvenca PEST klonirana je N – terminalno. Novokreirani pCS2+ mCherry-T2A –PEST- Cre^{ERT2} plazmid veličine je 6967 parova baza, a njegova mapa prikazana je na slici 5. Plazmid je umnožen u bakterijama *E. coli* nakon transformacije. Nakon uzgoja bakterijskih kolonija plazmidi su izolirani i provjereni

sekvenciranjem. Plazmidi kod kojih je sekvenca PEST ugrađena u pravilnoj orijentaciji korišteni su za produkciju mRNA.

Osim sekvence PEST novo stvoreni plazmid ima i sekvencu za protein mCherry (Slika 5). Ovaj protein spada u grupu crvenih fluorescentnih proteina, te se koristi za označavanje stranica ili praćenje kretanja staničnih tekućina. Zbog toga je moguće nakon inndukcije rekombinacije opaziti i pojavu crvene fluorescencije na injektiranim embrijima. Stvoreni plazmid pCS2+ mCherry-T2A-Cre^{ERT2} sadrži i sekvencu ER. Pomoću te sekvence omogućeno je vezivanje rekombinaze Cre na estrogenski receptor. U prisutnosti liganda (tamoksifena) taj receptor mjenja konformaciju i omogućava unos rekombinacije u jezgru.



Slika 5. Mapa pCS2+ *mCherry-T2A -PEST- Cre^{ERT2}* vektora napravljena u računalnom programu ApE plazmid editor.

4.2. Testiranje mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu Cre

Testiranjem mRNA vektora za stabilnu te za destabiliziranu rekombinazu Cre željelo se pronaći koncentraciju pri kojoj se proces rekombinacije ne odvija spontano, već samo uz indukciju tamoksifenom. Naime, kod visokih koncentracija rekombinaze ona ulazi u jezgru i djeluje neovisno o induktoru tamoksifenu. Ukoliko se ta koncentracija pronađe, potrebno je usporediti postoji li razlika u koncentracijama potrebnima za indukciju između stabilne i nestabilne rekombinaze. Linija riba korištena za injiciranje je bila *Tg(hsp:loxPDsRedstoploxPEGFP)* (Kroehne 2011).

U prvom krugu eksperimenata u embrije je injektirana velika koncentracija mRNA Cre ERT2 i PEST- Cre ERT2: 250 pg/ μ L. Ovako velika koncentracija mRNA injicirana je da bi se potvrdilo jesu li proteini Cre ERT2 i PEST- Cre ERT2 učinkoviti u kataliziranju rekombinacije na regijama loxP u ovoj transgeničnoj liniji.

Embriji s injektiranom mRNA PEST- Cre^{ERT2}, kao i embriji s injektiranom Cre^{ERT2} pokazali su i crvenu i zelenu fluorescenciju nakon indukcije toplinskim šokom. Naime, transgenična linija ribe zebrice *Tg(hsp:loxPDsRedstoploxPEGFP)* ima gene za fluorescentne proteine pod promotorom ovisnim o indukciji toplinskim šokom, tako da se samo nakon indukcije javlja fluorescencija. Ako nije došlo do rekombinacije, proizveden će biti crveni fluorescencijski protein. Zelena fluorescencija pokazuje da se rekombinacija uspješno odvila i da je sekvenca koja kodira crveni fluorescentni protein izrezana (Kroehne 2011). Pojava zelene fluorescencije također pokazuje da je mRNA konstrukta PEST- Cre^{ERT2} translacijom proizvela aktivnu rekombinazu (Slika 6). Međutim, embriji mogu pokazati crvenu fluorescenciju i kao posljedicu transkripcije rekombinaze fuzionirane sa sekvencom koja kodira crveni fluorescentni protein mCherry kod visokih koncentracija mRNA.



Slika 6. Injektirani embriji, 250 pg, 32 hpf, slikano pod fluorescencijskim mikroskopom.

Prethodni pokusi u kojima se testirala učinkovitost rekombinaze Cre na drugim transgeničnim linijama riba zebrica primijetili su ekspresiju gena Cre ERT2 neovisnu o indukciji pri koncentraciji većoj od 20 pg/ μ L (leakiness) (Juliane Pfeil, razgovor). Stoga su koncentracije mRNA oba konstrukta u idućem krugu mikroinjiciranja smanjene deset puta, te je korišteno 25 pg mRNA.

Nakon injektiranja 25 pg mRNA, pokazalo se da nema značajne razlike u ekspresiji konstrukta (Slika 7), tj. da je bio jednak omjer zelenih fluorescentnih ribica kod unosa mRNA stabilne i nestabilne rekombinaze. Pojava zeleno fluorescirajućih embrija bez dodavanja liganda pokazala je da se proces rekombinacije događa spontano tj. da rekombinaza može ući u jezgru. Stoga su koncentracije injektiranih mRNA u narednim krugovima mikroinjiciranja postupno smanjivale sve do 0,5 pg/ μ L. Sveukupno je napravljeno devet eksperimenata mikroinjiciranja da bi se našla optimalna koncentracija kod koje bi se mogle primijetiti razlike u postotku zelenih fluorescentnih embrija, tj. vidjeti utjecaj povećanja razgradnje proteina GFP zbog sekvence PEST.



Slika 7. Injektirani embriji, 25 pg, 72 hpf, slikano pod fluorescencijskim mikroskopom. Gornje slike prikazuju embrije pod filterom koji detektira crvenu fluorescenciju (RFP= 588 nm), dok donje pokazuju iste embrije pod filterom za detekciju zelene fluorescencije (500 nm).

Kao što je vidljivo iz Tablice 1, injektirane koncentracije do 0,5 pg/ μ L pokazuju ekspresiju GFP i bez indukcije tamoksifenom. Pri koncentraciji od 0,5 pg/ μ L pojava spontane ekspresije GFP-a je bila znatno smanjena i samo je ukupno 4,1 % kod rekombinaze divljeg tipa i 7,8 % kod unosa mRNA rekombinaze sa sekvencom PEST pokazalo rekombinaciju. Embriji su zatim inducirani tamoksifenom, da bi vezanje liganda na fuzijski protein sa estrogenskim receptorom CreER omogućilo ulazak rekombinaze u jezgru i njeno djelovanje. Dodavanje tamoksifena embrijima pokazalo je pojavu rekombinacije u jednom embriju s ekspresijom rekombinaze divljeg tipa (Tablica 1).

Tablica 1. Analiza mikroinjiciranja mRNA mCherry-T2A-Cre^{ERT2} i mCherry-T2A-PESTCre^{ERT2} različitih koncentracija u embrije ribe zebrice pod fluorescencijskim mikroskopom, TAM- koncentracije u koje je dodan tamoksifen, mCherry-T2A-Cre^{ERT2}-injicirana mRNA plazmida za sintezu rekombinaze divljeg tipa, mCherry-T2A-PESTCre^{ERT2}-injicirana mRNA za sintezu fuzijske rekombinaze sa sekvencom PEST, EGFP+ - prisutna zelena fluorescencija, EGFP- -odsutna zelena fluorescencija, %- postotak rekombinanata nakon indukcije toplinskim šokom.

		mCherry-T2A-Cre ^{ERT2}				mCherry-T2A-PESTCre ^{ERT2}			
	Injektirana koncentracija mRNA (pg/ µL)	Broj injektiranih embrija	EGFP+	EGFP-	%	Broj injektiranih embrija	EGFP+	EGFP-	%
1.	25	31	21	10	67,7	34	21	13	61,8
2.	25	31	21	10	67,7	27	13	14	48,1
3.	25	33	18	15	54,5	28	20	8	71,4
4.	5	30	14	16	46,6	24	20	4	83,3
5.	5	25	13	12	52,0	23	17	6	73,9
6.	5	69	60	9	86,9	67	61	6	91,0
7.	0.5	24	1	23	4,2	15	1	14	6,7
8.	0.5	25	2	23	8,0	17	2	15	11,8
9.	0.5	24	0	24	0	19	1	18	5,2
10.	0.5 (+TAM)	24	1	23	4,2	15	1	14	6,7
11.	0.5 (+TAM)	25	2	23	8,0	17	2	15	11,8
12.	0.5 (+TAM)	24	1	23	4,2	19	1	18	5,2

5. RASPRAVA

Danas postoje različite metode kontrole ciljane genske ekspresije u riba zebrica. Rekombinacijski sustav Cre/loxP i kontrola genetske ekspresije pomoću transpozona Tol2 (Suster i sur. 2009) dvije su najčešće korištene metode genetičkog označavanja stanica.

Rekombinacijski sustav Cre/loxP omogućava ciljano uključivanje/isključivanje gena u vremenu i prostoru (Kuhn i Torres 2002). Sustav omogućava npr. obilježavanje jedne stanice i zatim njeno praćenje tijekom diferencijacije ili proliferacije. Rekombinaza Cre može se biti regulirana različitim promotorima, a ako se koristi za praćenje stanica u proliferaciji, obično se nalazi pod promotorom aktivnim samo u fazi S. Osim toga, rekombinaza se najčešće fuzionira sa sekvencom estrogenskog receptora tako da se dodatkom liganda može inducirati njezin unos u jezgru.

Osim indukcije rekombinaze Cre tamoksifenom, postoji još metoda kojima se Cre/loxP sustav može inducirati. To je, na primjer, indukcija sustava tetraciklinima (Utomo i sur. 1999). Tetraciklini, za razliku od tamoksifena koji regulira unos proteina u jezgru, na proteinskoj razini, reguliraju transkripciju ciljanog gena specifičnim inducibilnim promotorima (Logie i Stewart 1995; Metzger i sur. 1995).

Međutim, analiza produkata nastalih kao posljedica djelovanja rekombinaze Cre pokazuje da je njezina ekspresija nije uvijek tako specifična. Upravo ta nespecifičnost jedan je od glavnih nedostataka u korištenju rekombinacijskog sustava Cre/loxP (Sauer 1998) za praćenje staničnih linija.

Glavna postavka ovog istraživanja je ta da bi smanjenje poluživota rekombinaze Cre i pronalaska koncentracije pri kojoj je ona inducibilna isključivo dodavanjem liganda omogućilo specifično praćenje stanica. Naime, ako bi se postigla dovoljna osjetljivost metode, dodatak tamoksifena bi omogućio "uključivanje" fluorescentnog biljega u točno određenom vremenskom periodu ili u specifičnom tkivu tijekom razvoja modelnog organizma.

S obzirom na pretpostavku da bi se destabiliziranjem rekombinaze Cre vrijeme njezine aktivnosti skratilo (Li i sur. 1998), sekvenca u vektoru pCS2+ mCherry-T2A-

Cre^{ERT2} destabilizirana je dodavanjem sekvence PEST. Ovakva rekombinaza kratkog poluživota omogućila bi smanjenje pojave nespecifične rekombinacije. Sekvenca ugrađena na N – terminalni kraj sekvence za rekombinazu Cre, budući da se estrogenski receptor, važan u indukciji rekombinacije tamoksifenom, nalazi na C – terminalni kraju, te je bitno izbjeći potencijalne steričke smetnje.

Očekivano je da vektor sa sekvencom za nestabilnu rekombinazu Cre ima manju učinkovitost rekombinacije od vektora sa sekvencom za stabilnu rekombinazu Cre (Ninov i sur. 2012). Razlika u učinkovitosti očituje se u manjem broju rekombiniranih embrija pri injektiranoj određenoj koncentraciji mRNA konstrukata. Rekombinantni embriji prepoznaju se po pojavi zelene fluorescencije uzrokovane eksprimiranjem proteina EGFP kao posljedice uspješnog djelovanja rekombinantnog sustava Cre/loxP. Ovisno o koncentraciji injektirane mRNA, rekombinacija se može dogoditi spontano (posljedica prevelike koncentracije rekombinaze Cre u citoplazmi) (Hans i sur. 2009) ili nakon indukcije ligandom (tamoksifen). S obzirom da se radi o genetičkom praćenju staničnih linija, injekcije mRNA su bile u embrije koje se nalaze u jednostaničnoj fazi životnog ciklusa, kako bi se injektirani konstrukt genetički ugradio te prenio na sve stanice nastale daljnjim diobama. Eksperimenti s visokim koncentracijama mRNA Cre – PEST i Cre pokazali su da su oba konstrukta funkcionalna i da je došlo do rekombinacije sa sličnom efikasnošću (oko 60 %). Međutim, do ekspresije zelenog fluorescentnog proteina došlo je bez indukcije tamoksifenom, spontano, budući da je visoka koncentracija rekombinaze omogućila njezin ulazak u jezgru.

Injektirana koncentracija mRNA potom se smanjila na 25 pg/μL, budući da su prethodna istraživanja pokazala da je granična koncentracija mRNA Cre kod koje dolazi do njenog spontanog propuštanja u jezgru oko 20 pg/ μL (Juliane Pfeil, osobna komunikacija). Iako je očekivano bilo da se pri toj koncentraciji primijeti razlika u učinkovitosti konstrukta, rezultati nisu pokazali značajnu razliku te je omjer embrija koji eksprimiraju i onih koji ne eksprimiraju EGFP pod djelovanjem Cre mRNA i PEST – Cre mRNA bio sličan (63,2% i 60,1%). Koncentracija mRNA oba konstrukata zatim je smanjena na 5 pg/μL, međutim, i tada je došlo do spontane pojave rekombinantnih jedinki. To pokazuje da i pri koncentraciji od 5 pg/ μL, količina PEST – Cre i Cre u citoplazmi je još uvijek dovoljno velika da se rekombinacija dogodi spontano.

Nakon rasprave i savjetovanja (Heiner Grandel i Stefan Hans, osobna komunikacija) zaključeno je da je potrebno dodatno smanjiti koncentraciju s ciljem nalaženja koncentracije pri kojoj receptor za Cre u citoplazmi nije prezasićen, te je sustav inducibilan isključivo dodavanjem tamoksifena. Pri injekcijama 0.5 pg mRNA oba, rekombinantni embriji su se javili kod 4-14 % riba. To se moglo dogoditi iz dva razloga: ili je napokon pronađena optimalna koncentracija pri kojoj se aktivnost Cre/loxP rekombinacijskog sustava može inducirati ligandom, ili je injektirana koncentracija mRNA konstrukata preniska za induciranje rekombinacije. Da bi se dobio odgovor na ovu pretpostavku, embriji injektirani sa po 0.5 pg mRNA oba konstrukta tretirani su tamoksifenom. Nakon analize samo jedan embrij tretiran mRNA koja sadrži sekvencu za stabilnu rekombinazu Cre pokazao je rekombinaciju. Zaključujemo da bi, s obzirom na pojavu rekombinanta, koncentracija od 0,5 pg/ μ L mogla biti koncentracija pri kojoj je sustav inducibilan isključivo s tamoksifenom. Kako bi se to potvrdilo, potrebno je napraviti dodatna injektiranja rubnih koncentracija u rasponu od 0.5 – 5 pg/ μ L (Heiner Grandel, osobna komunikacija).

Nakon indukcije tamoksifenom, embrij u kojem se odvila rekombinacija pojavio se u leglu koje je injektirana mRNA koja sadrži stabilnu sekvencu za rekombinazu Cre. Moguće je da PEST sekvenca fuzionirana na konstrukt Cre ne dovodi do bržeg degradiranja rekombinaze Cre. Jedan od razloga za to može biti da PEST sekvenca fuzionirana na N – kraju vektora nije funkcionalna. Stoga je jedan od predloženih koraka u analizi uspješnosti PEST – Cre vektora taj da se ponovi fuzioniranje PEST sekvence na vektor pCS2+ mCherry-T2A-Cre^{ERT2}, međutim ovaj puta na C – terminalni kraj vektora.

6. ZAKLJUČAK

1. Konstruiran je plazmid sa sekvencom za rekombinazu Cre fuzioniran sa sekvencom PEST koja omogućuje kratak poluživot proteina rekombinaze. Rezultati sekvencioniranja pokazali su da je uspješno kreiran plazmid pCS2+ mCherry-T2A – PEST- Cre^{ERT2}.
2. Transkripcijom s plazmida koji kodiraju za stabilnu i nestabilnu rekombinazu Cre (Cre i Cre-PEST) proizvedena je njihova mRNA *in vitro*
3. mRNA za stabilnu i nestabilnu rekombinazu testirane su mikroinjiciranjem u oplodene jajne stanice ribe zebrice soja *Tg(hsp:loxP**DsRed**stoploxP**EGFP**)*, *in vivo*
4. Analiza embrija injektiranih viskom koncentracijom (250 pg/ μ L) mRNA pokazala je da fuzioniranje sekvence PEST ne utječe na funkciju rekombinaze Cre i da je došlo do rekombinacije. Pojava rekombinantnih jedinki vidljiva je kao zelena fluorescencija (EGFP protein) pod fluorescencijskim mikroskopom.
5. Injektiranje većih koncentracija (250 pg/ μ L, 25 pg/ μ L i 5 pg μ L) mRNA Cre i Cre – PEST uzrokuje spontani ulazak rekombinaze u jezgru, bez dodavanja liganda tamoksifena koji bi trebao omogućiti ulazak enzima u jezgru. 0.5 pg/ μ L je donja granična koncentracija mRNA pri kojoj se dogodila rekombinacija. Kod te koncentracije mRNA jedan uzorak je od 73 embrija iniciranih s mRNA Cre pokazao inducibilnost tamoksifenom.

7. LITERATURA

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802–805.

Clelland E., Peng C. (2009): Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **312**: 42–52.

Engeszer R.E., Patterson L. B., Rao A. A., Parichy D. M. (2007): Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* **4**: 21–U126.

Feil R., Wagner J., Metzger D., Chambon P. (1997): Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding. *Biochemical and biophysical research communications*. **237**:752–757.

Fleming A. (2007): Zebrafish as an alternative model organism for disease modelling and drug discovery implications for the 3R's. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London.
Dahm R., Nüsslein-Volhard C. (2002): *Zebrafish - A Practical Approach* . Oxford University Press, Oxford.

Gerhard G. S., Kauffman E. J., Wang X. J., Stewart R., Moore J.L., Kasales C.J.(2002): Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Experimental Gerontology* **37**: 1055–1068.

Ghoda L., van Daalen Wetters T., Macrae M., Ascherman D., Coffino P. (1989): Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* **243**: 1493–1495.

Hamilton D.L., Abremski K. (1984): Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synopsis of two lox sites. *Journal Molecular Biology* **178**:481–486.

Hans S., Kaslin J., Freudenreich D., Brand M. (2009): Temporally-controlled site-specific recombination in zebrafish. *PLoS ONE* **4**(2):e4640.

Kretzschmar K., Watt F.M. (2012): Lineage tracing. *Cell* **148**: 33-45.

- Kuhn R., Torres R.M. (2002): Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting. *Methods Mol Biol* **180**: 175-204.
- Laale H. (1977): The biology and use of zebrafish *Brachydanio rerio* in fisheries research: a literature review. *Journal of Fish Biology* **10**: 121-173.
- Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C., Kain S.R. (1998): Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *The journal of biological chemistry* **273**:34970-34975.
- Logie C., Stewart, A.F. (1995): Ligand-regulated site-specific recombination. *PNAS* **92**(13):5940-5944.
- Matthews M., Trevarrow B., Matthews J. (2002): A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Animal* **31**: 34–40.
- Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P., (1995): Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *PNAS* **92**(15):6991-6995.
- Ninov N., Borius M., Stainier D. Y. R. (2012): Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* **139**: 1557-1567.
- Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer R.E. (2009): Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics* **238**: 2975–3015.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene (Amst.)* **111**: 229–233.
- Rechsteiner M., Rogers S.W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**:267–271.
- Sauer B. (1998): Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods* **14**(4): 381-92.

Schilling T.F. (2002): The morphology of larval and adult zebrafish. U: Zebrafish. Oxford, Oxford University Press, 59-94.

Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J. Cell. Comp. Physiol. **59**: 223–39.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. (2008): The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews **83**: 13–34.

Stern H.M., Zon L.I. (2003): Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. Nature reviews- Cancer **3**: 1-7.

Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. (1981): Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature **291**: 293–296.

Suster M.L., Kikuta H., Urasaki A., Asakawa K., Kawakami K. (2009): Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. Methods Mol Biol. **561**:41-63.

Talling J.F., Lemoalle J. (1998): Ecological Dynamics of Tropical Inland Waters. Cambridge University Press, Cambridge.

Tsien R. Y.(1998):The green fluorescent protein. Annual Review Biochemistry **67**:509–44.

Utomo A.R., Nikitin A.Y., Lee W.H. (1999): Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. Nature Biotechnology **17**(11): 1091-1096.

Vogt W. (1929): II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Arch. Entwicklungsmech. Org. **120**: 384–706.

Whitfield, T.T. (2002): Zebrafish as a Model for Hearing and Deafness. Journal of Neurobiology **53**(2):157 - 171.

Yossa R., Sarker P.K., Karanth S., Ekker M., Vandenberg G.W. (2011): Effects of dietary biotin and avidin on growth, survival, feed conversion, biotin status and gene expression of zebrafish *Danio rerio*. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **160**: 150–158.

<https://crezoo.crt-dresden.de/crezoo/> Pristupljeno: 20.01.2015.

www.fishbase.org Pristupljeno: 18.01.2015.