

Nokaut miševi: klasični vs. moderni pristup

Gvozdenica Šipić, Roko

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:597621>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Preddiplomski studij molekularne biologije

Roko Gvozdenica Šipić

Nokaut miševi: klasični vs. moderni pristup

**Knockout mice: classic vs. modern
approach**

Završni rad

Zagreb, 2021.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Nenada Malenice.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Otkrića koja su omogućila stvaranje KO linija	2
3. Klasične metode	3
3.1. <i>Gene trapping</i>	3
3.2. <i>Gene targeting</i>	4
4. Moderne metode.....	8
4.1. ZFN i TALEN	8
4.2. CRISPR/Cas9	10
5. Komercijalna proizvodnja KO miševa	15
6. Literatura	16
7. Sažetak	21
8. Abstract	22
9. Životopis.....	23

1. Uvod

Miš (*Mus musculus*), iako prvi, i dalje je najpopularniji modelni organizam za biomedicinska istraživanja na sisavcima. Njegova korisnost leži u lakoći i niskoj cijeni uzgoja, kratkom generacijskom vremenu (spolna zrelost dostiže za samo 6-8 tjedana) i malom prostoru koji je potreban za uzgoj. S fiziološkog gledišta, njihovi organski sustavi pokazuju brojne sličnosti s ljudskim kardiovaskularnim, reproduktivnim, probavnim, endokrinim i živčanim sustavima. Te kvalitete čine ih izvrsnim subjektima za istraživanje razvoja, patologije bolesti i starenja (Vanhooren i Libert 2013). Zajedno sa štakorima (*Rattus norvegicus*) čine oko 95% svih laboratorijskih životinja (<https://www.cshl.edu/of-mice-and-model-organisms/>). Genom miša sadrži oko 3,5 milijuna parova baza (Mpb) i kodira za preko 23 tisuće proteina, a kompletna sekvenca objavljena je 2002. godine. (<https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research>). Također, dijele oko 85% kodirajućeg genoma s ljudima, što ih čini izvrsnim modelima za translacijske i reverzno-translacijske studije, te razna medicinska testiranja kao što je podložnost anestheticima (Wasilczuk i sur. 2018), efikasnost terapije antibioticima (Roque i sur. 2007), djelovanje opijata na organizam (Kieffer 1999) i sl.

Knockout (KO, genski nokaut) miševi su miševi u kojima je tehnikama genetičkog inženjerstva zamijenjena jedna varijanta gena drugom s ciljem njegova isključivanja, odnosno dokidanja njegove funkcije. Podvrsta ove metode je unos potpuno novoga gena, u kojem slučaju govorimo o ugradnji gena tzv. *knockin*-u (KI, genski unos). Takvi miševi koriste se za proučavanje funkcije dotičnoga gena preko patoloških posljedica njegove nefunkcionalnosti (Majzoub i Muglia 1996; Hall i sur. 2018).

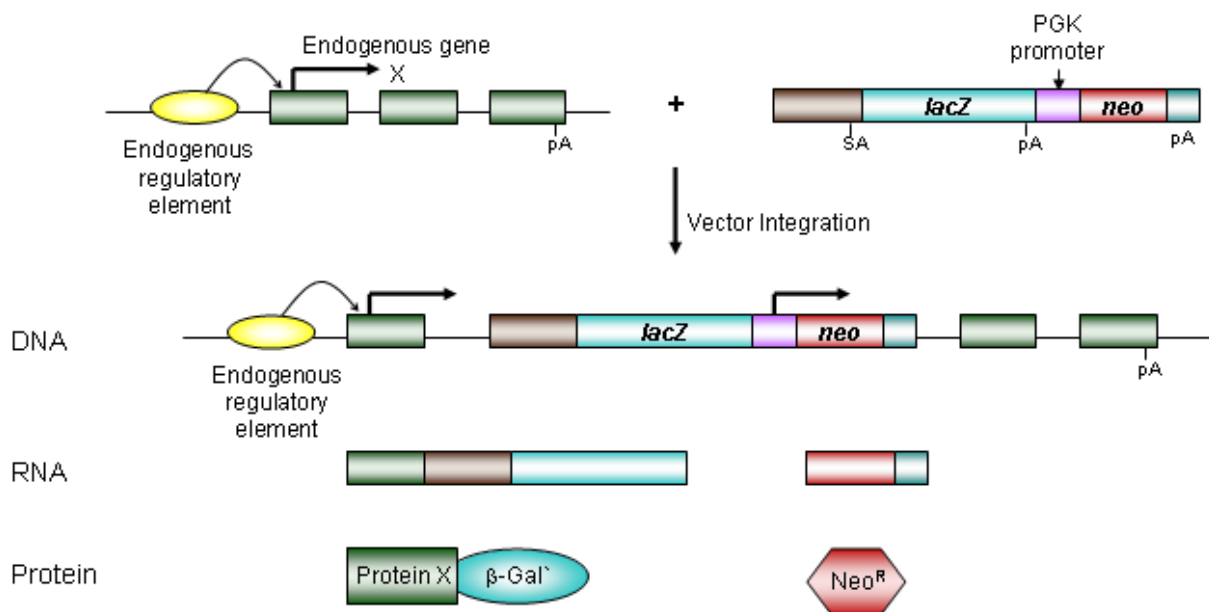
2. Otkrića koja su omogućila stvaranje KO linija

Mogućnost inaktivacije, zamjene ili dodavanja novih gena u odabrani organizam i njihovog prijenosa na potomstvo neke su od ideja koje su postojale od samih početaka genetike kao znanosti. Njenu realizaciju omogućilo je nekoliko vrlo važnih otkrića. Martin Evans sa Sveučilišta Cambridge prvi je izolirao embrionalne matične stanice (EMS) miša i uzgajao ih u staničnoj kulturi. Takve stanice zarazio je rekombinantnim retrovirusom i pokazao kako injekcijom takvih stanica u mišju blastocistu dolazi do nastanka kimernog miša, koji potom križanjem može dati potomstvo koje će ekspimirati retroviralni gen u svim svojim stanicama. Oliver Smithies i Mario Capecchi u kulturi EMS, neovisno jedan od drugog, homolognom su rekombinacijom korigirali defektan gen za hipoksantin fosforiboziltransferazu (HPRT), koji je kod ljudi odgovoran za rijetki Lesch-Nyhanov sindrom. Za svoja otkrića Evans, Smithies i Capecchi 2007. godine podijelili su Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2007/summary/>). Međutim, to formalno nisu bili prvi transgenični miševi. Naime, 1974. godine Rudolf Jaenisch i Beatrice Mintz uzgajali su prvoga transgeničnog miša. Injekcijom DNA virusa SV40 (*simian virus 40*) u blastocel mišjih blastocista postigli su ugradnju viralnog genoma u iz njih nastale miševe (Jaenisch i Mintz 1974). Tri godine kasnije Jaenisch, ovaj put koristeći M-MuLV (*Moloney leukemia virus*) retrovirus, pokazao je kako na taj način dobiveni transgenični miševi mogu prenijeti unesene gene na svoje potomstvo, što je rezultiralo stvaranjem prve transgenične mišje linije (Jaenisch 1977). Od tada do danas genetski modificirani miševi postali su nezamjenjiv alat u genetičkim istraživanjima.

3. Klasične metode

3.1. Gene trapping

Među prvim razvijenim visokoprotočnim metodama proizvodnje KO miševa bila je metoda nasumične ugradnje, tzv. *gene trapping*. Radi se o ugradnji reporter gena bez promotora u neki transkripcijski aktivan lokus. Takav gen koristit će endogeni promotor za svoju ekspresiju. Transkript će zbog preuranjenog stop kodona kodirati za fuzijski protein N – terminalnog dijela predmetnog proteina i reportera, ili pak samo za reporter ako je do ugradnje došlo prije start kodona predmetnog gena (Schnütgen i sur. 2008). Rezultat nasumične ugradnje je narušavanje ekspresije predmetnog gena, a prateći aktivnost reportera moguće je odrediti točno o kojemu lokusu/genu se radi. U ovu svrhu najčešće korišteni reporter je gen *lacZ* koji kodira za enzim beta-galaktozidazu, iako se mogu koristiti i drugi geni poput onoga za alkalnu fosfatazu (Evans 1998). U kombinaciji s reporterom često se unosi i gen za rezistenciju na antibiotik, poput neomicin fosfotransferaze (*neo*) i histidol dehidrogenaze (*his*), kako bi se omogućila jednostavna selekcija uspješno transformiranih stanica (Skarnes 1993). Shematski prikaz mehanizma *gene trapping* vidljiv je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz mehanizma *gene trapping*. Kao inaktivirajući vektor korišteni su geni za beta-galaktozidazu (*lacZ*) i neomicin fosfotransferazu (*neo*), koji dolazi s vlastitim promotorom, na slici obojenim ljubičasto. Gen *lacZ* ekspimirira se pomoću endogenog promotora (žuto). Konačni protein fuzijski je produkt N-terminalne domene endogenog proteina i beta galaktozidaze. SA- 5' splice mjesto, pA 3'- poliA rep.

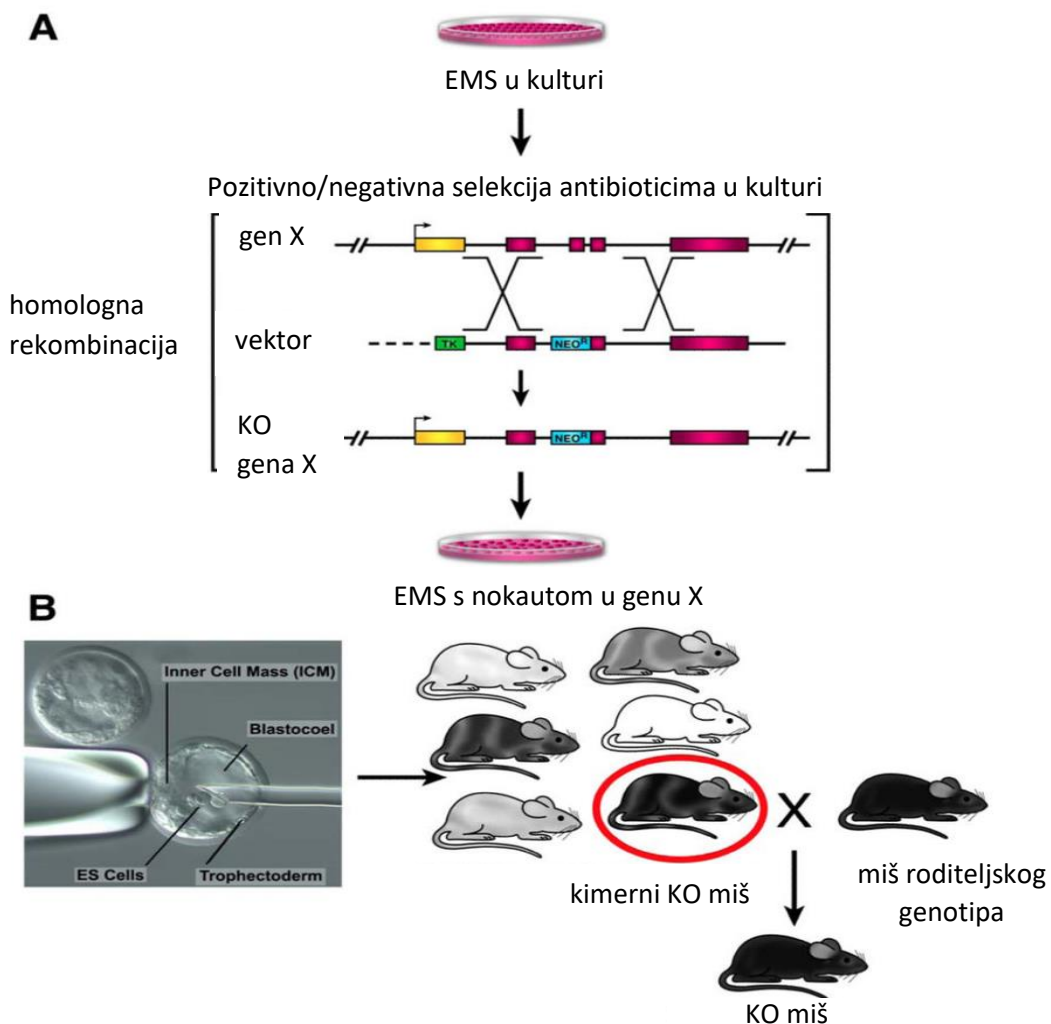
Varijanta ove metode uključuje unos pojačivača (*enhancer*) skupa s reporterom. Naime, ako se reporter ugradi u transkripcijski neaktivan lokus, neće biti moguće detektirati njegovu aktivnost. Unosom egzogenog pojačivača skupa sa reporterom pojačava se aktivnost endogenog promotora i omogućuje detekcija reportera, što čini ovu metodu primjenjivom i na lokuse niske transkripcijske aktivnosti (Schnütgen i sur. 2008). Vektori kojima se gen reporter može unijeti su različiti: to mogu biti umjetni DNA plazmidi uneseni elektroporacijom, rekombinantni retrovirusi i dr. (Evans i sur. 1997; Evans 1998). Nakon inaktivacije gena u EMS, potrebno je selektirati uspješno transformirane stanice. To se čini korištenjem već spomenutih selektivnih gena (rezistencija na antibiotike), tako da će preživjeti jedino one stanice u kojima je došlo do ugradnje vektora u transkripcijski aktivan lokus. Nakon identifikacije isključenog gena, primjerice nekom od metoda zasnovanoj na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) poput 5' RACE (Skarnes 2005), stanice od interesa potrebno je injicirati u blastocistu, koja se potom prenosi unutar maternice pseudogravidnog miša (Capecchi 1989). Tako nastali kimerni miš povratno se križa s ciljem dobivanja KO miša. Potomstvo koje naslijedi inaktivirani gen bit će heterozigotno za taj lokus, s jednim inaktiviranim i jednim funkcionalnim alelom. Međusobnim križanjem takvih heterozigotnih miševa moguće je konačno dobiti homozigotne jedinke (<https://www.genetargeting.com/knockout/knockout-mouse-made/>). Glavni nedostatak ove metode je nemogućnost ciljane ugradnje vektora, što čini proizvodnju pojedinačnih KO linija skupom i vremenski zahtjevnom. Također, moguće je dobiti KO miševe samo u onim genima koji su transkripcijski aktivni u EMS (Skarnes 2005), zbog čega se ova metoda najčešće koristi u kombinaciji s *gene targeting* metodom.

3.2. Gene targeting

Nedostatke metode *gene trapping* pokušalo se nadomjestiti metodom *gene targeting* tj. ciljanom inaktivacijom gena. Ona se zasniva na mjesno specifičnoj modifikaciji genoma EMS pomoću supstitucijskog ili insercijskog vektora. Supstitucijski vektor služi zamjeni jednoga alela drugim u lokusu od interesa, dok se insercijski vektor ugrađuje unutar sekvence gena kako bi se narušila njegova ekspresija. Pozitivna selekcija se kao i kod metode *gene trapping* obavlja pomoću kazete za antibiotsku rezistenciju npr. neomicin. Međutim, s obzirom na to da se radi o metodi ciljane modifikacije, potrebno je izvršiti i negativnu selekciju kako bi se eliminirale stanice u koje se vektor ugradio nespecifično. To se može učiniti dodatkom gena koji stanice

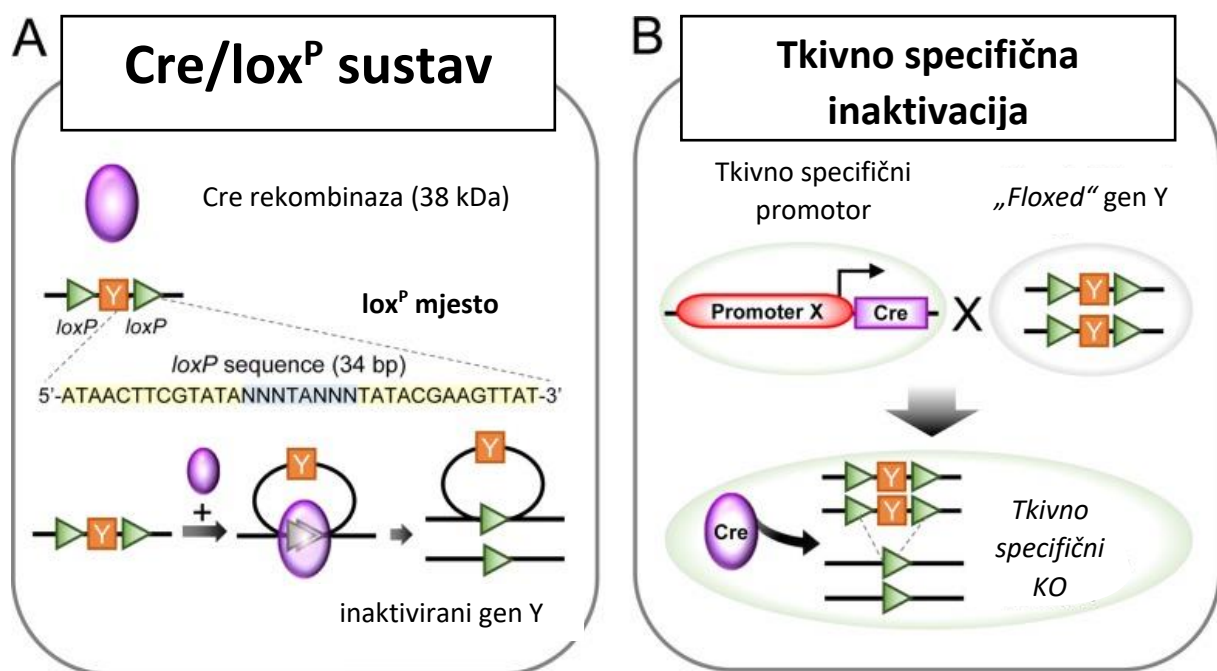
čini osjetljivima na neki antibiotik, primjerice ganciklovir, koji se nalazi izvan homologijom omeđenih regija konstrukta. Ako dođe do ugradnje toga gena, znači da se konstrukt nije rekombinirao s lokusom od interesa, već drugdje nespecifično ugradio. Pri ispravnoj rekombinaciji, taj gen ostat će neugrađen jer se nalazi izvan regije omeđene homolognim sekvencama (Thomas i Capecchi 1987; Capecchi 1989; Majzoub i Muglia 1996; Muller 1999).

Prvi uspješan pokušaj takve strategije koji je rezultirao mišjom KO linijom sastojao se od zamjene defektnog HPRT alela funkcionalnim u mišjim EMS, iz kojih je već opisanom metodom injekcije u zdravu blastocistu dobiven kimerni, a potom i KO miš (Thompson i sur. 1989). Na slici 2. shematski je prikazan postupak dobivanja KO miša postupkom *gene targeting*.



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje KO miševa metodom *gene targeting* (A) te naknadna mikroinjekcija EMS u blastocistu i križanje kimernih miševa (B). Nakon unosa vektora u EMS stanice, uspješno transformirane pozitivno i negativno se selektiraju pomoću tretmana antibioticima. Na slici je prikazana ugradnja gena za rezistenciju na neomicin, obojenog plavom bojom, unutar hipotetskog gena X, čime on biva inaktiviran zbog unosa preuranjenog STOP kodona. Nakon što se iz blastociste u koju su mikroinjicirane transformirane EMS razvije kimerni miš, njega se križa s mišem roditeljskoga genotipa. Tako dobivene miševe heterozigotne za inaktivirani alel međusobno se križa s ciljem dobivanja homozigota, tj. utemeljitelja nove KO linije.

Slaba efikasnost ove metode posljedica je relativno niske učestalosti homologne rekombinacije u EMS, što i dalje zahtijeva veliku količinu sredstava i uloženog rada za proizvodnju samo jedne KO linije. Korak dalje u povećanju efikasnosti rekombinacije sastojao se u uvođenju lox^P mjesta u genom EMS koja prepoznaje Cre rekombinaza iz bakteriofaga P1. Mjesta lox^P duga su 34 bp i sastoje se od dvaju obrnutih ponavljanja (*inverted repeats*) duljine po 13 bp između kojih se nalazi nepalindromska sekvenca duljine 8 bp. Gen od interesa obično je lociran između dva lox^P mjesta (*floxed gene*) i kada dođe do Cre rekombinazom potpomognute homologne rekombinacije dotični gen biva deletiran tako što dolazi do preklapanja lox^P mjesta i izrezivanja sekvence koja se nalazi između njih (Kim i sur. 2018). Također, tkivno specifičnom ekspresijom Cre rekombinaze ili njenim selektivnim uključivanjem moguće je dobiti znatno veću razinu kontrole nad genskim isključivanjem nego prije. Tim pristupom postigla se frekvencija rekombinacije vektora od 80% i više, u usporedbi s manje od 5% bez korištenja Cre/lox^P sustava (Orban i sur. 1992; Sauer 1998). Na slici 3. vidljiv je shematski prikaz Cre/lox^P sustava.



Slika 3. Shematski prikaz Cre/lox^P sustava. (A) Prikazan tipičan slijed inaktivacije zamišljenoga gena Y. (B) Prikazana je tkivno specifična inaktivacija gena Y uslijed ugradnje gena koji kodira za Cre rekombinazu pod promotor koji je aktivan samo u stanicama određenoga tkiva.

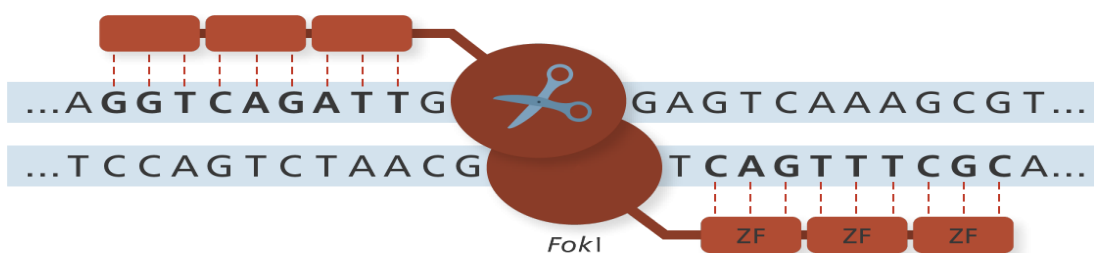
Još jedan pristup kojim je povećana efikasnost proizvodnje KO linije sastoji se u manipulaciji spermatogonijalnih matičnih stanica umjesto embrionalnih, koje potom mogu biti unešene u gonade sterilnoga miša. Takav miš može dalje dati heterozigotno KO potomstvo iz kojega međusobnim križanjem može dobiti homozigotni KO miš. Ovaj pristup pokazao je uspješnost korištenja tkivno specifičnih matičnih stanica u svrhu proizvodnje KO linija. Također, eliminirao je potrebu za selektiranjem onih kimernih miševa u kojima su gonade potekle iz transformiranih matičnih stanica (Shinohara i sur. 2006). Međutim, usprkos svim poboljšanjima, metoda *gene targeting* dugotrajna je te zahtijeva korake selekcije i križanja, zbog čega se nastojalo pronaći alternativne metode proizvodnje KO linija koje bi bile brže, jednostavnije, a time i jeftinije.

4. Moderne metode

4.1. ZFN i TALEN

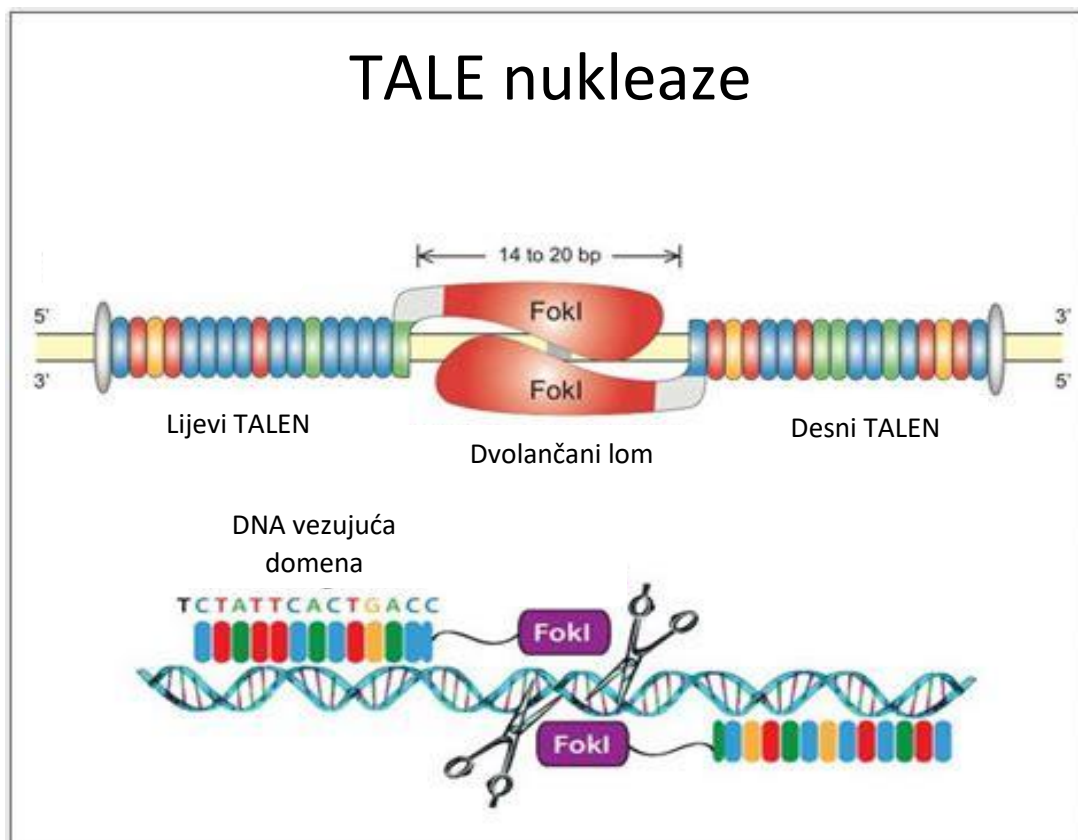
Proboj u efikasnosti i jednostavnosti ciljane genetske modifikacije dogodio se otkrićem dizajniranih endonukleaza s DNA vezujućim proteinskim domenama. Nukleaze cinkovih prstiju (ZFN, *zinc finger nucleases*) umjetne su endonukleaze sastavljene od DNA vezujuće ZFN domene, oligopeptidne spojnice i *FokI* endonukleaze tipa II. Proizveli su ih Kim i sur. s ciljem korištenja već poznatih enzima u nove svrhe dajući im novu razinu specifičnosti (Kim i sur. 1996). Djeluju kao dimeri, pri čemu svaki monomer reže jedan lanac DNA čime uzrokuju dvolančani lom. Svaka domena cinkova prsta može prepoznati jedan triplet nukleotida, a svaki ZFN monomer sadrži najčešće tri ili četiri takve domene (Porteus i Carroll 2005). Nastali lom može biti popravljen na dva načina: NHEJ (*non-homologous end joining*) i HDR (*homology directed repair*). Prvi je mehanizam sklon greškama, pa rezultira kratkim insercijama i delecijama te posljedičnim pomakom okvira čitanja, što dovodi do inaktivacije gena, u ovom slučaju poželjna ishoda. Ako se uz ZFN kompleks unese i homologni DNA kalup, nastali lom može se popraviti mehanizmom HDR, u slučaju kojeg dolazi do zamjene ili čak ugradnje novoga gena (Urnov i sur. 2010). Efikasnost ovoga sustava znatno je veća nego kod klasičnog *gene targeting* koji se oslanja na homolognu rekombinaciju, a postotak uspješno transformiranih stanica konzistentno je visok, pri čemu su često zabilježene stope >10% (Porteus i Carroll 2005; Carrol 2011). Shematski prikaz ZFN i njihova djelovanja vidljiv je na slici 4.

Nukleaze cinkovih prstiju (ZFN)



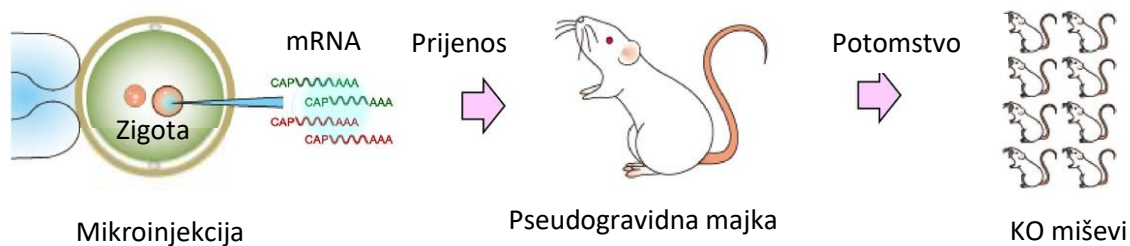
Slika 4. Shematski prikaz sustava ZFN. Svaki od monomera sadrži po tri domene cinkova prsta (ZF), od kojih svaka prepoznaje jedan triplet nukleotida. Endonukleazne domene *FokI* preklapaju se i zajedničkim djelovanjem unose dvolančani lom DNA.

Efektorske nukleaze nalik na transkripcijske aktivatore (TALEN, *transcription activator like effector nucleases*) endonukleaze su koje djeluju na sličnom principu kao i ZFN, te koriste istu *FokI* endonukleazu za cijepanje DNA. TALE proteini prvo su otkriveni u rodu bakterija *Xanthomonas* i sastoje se od peptidnih domena dugih 33 – 35 aminokiselina. Svaka od tih domena prepoznaje jedan par baza, a većina prirodnih TALE proteina sadrži 12 - 27 domena. Umjetno sintetizirani TALE proteini mogu sadržavati i više od 30 takvih domena. Specifična TALEN može se proizvesti u 5 dana protokolom *Golden Gate* (Cermak i sur. 2011; Gaj i sur. 2013). Shematski prikaz TALEN vidljiv je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz sustava TALEN. Sastoji se od dva TALEN monomera, od kojih svaki sadrži TALE DNA vezujući protein s 12 – 31 peptidne domene (prikazane šarenim elipsama) od kojih svaka prepoznaje po jedan nukleotidni par. Nukleaznu aktivnost daju dvije međusobno preklapljene *FokI* domene od kojih svaka cijepa jedan lanac DNA, što rezultira dvolančanim lomom.

Razvojem ZFN i TALEN i njihovom uspješnom primjenom na stanicama miša, vrijeme potrebno za generaciju KO linije smanjeno je s 8-10 mjeseci na oko 3 mjeseca. Razlog tomu je što je uređivanje genoma svedeno na proces od samo jednog koraka, pri kojemu se u zigotu mikroinjiciraju mRNA koje kodiraju za specifične ZFN ili TALEN, nakon čega se tako transformirana zigota implantira u uterus miša i rezultira KO embrijem (Hall i sur. 2018). Shematski prikaz postupka proizvodnje KO miša metodom ZFN je na slici 6. U usporedbi s klasičnim metodama koje su se oslanjale na transformaciju EMS mehanizmima niske efikasnosti kao što je homologna rekombinacija te selektiranju i križanju mišjega potomstva adekvatnog genotipa, evidentan je značajan napredak u lakoći utemeljenja nove KO linije.



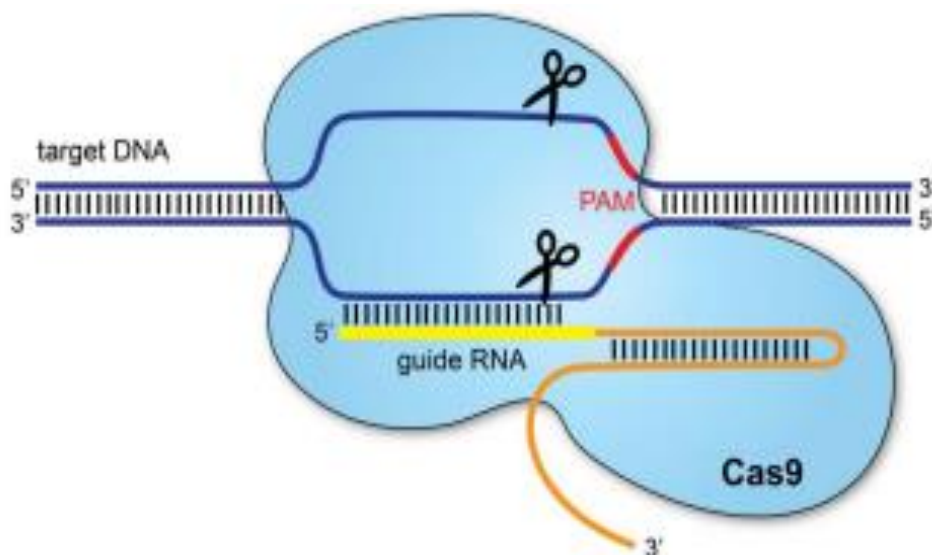
Slika 6. Shematski prikaz proizvodnje KO miševa metodom ZFN. Postupak proizvodnje metodom TALEN je analogan.

4.2. CRISPR/Cas9

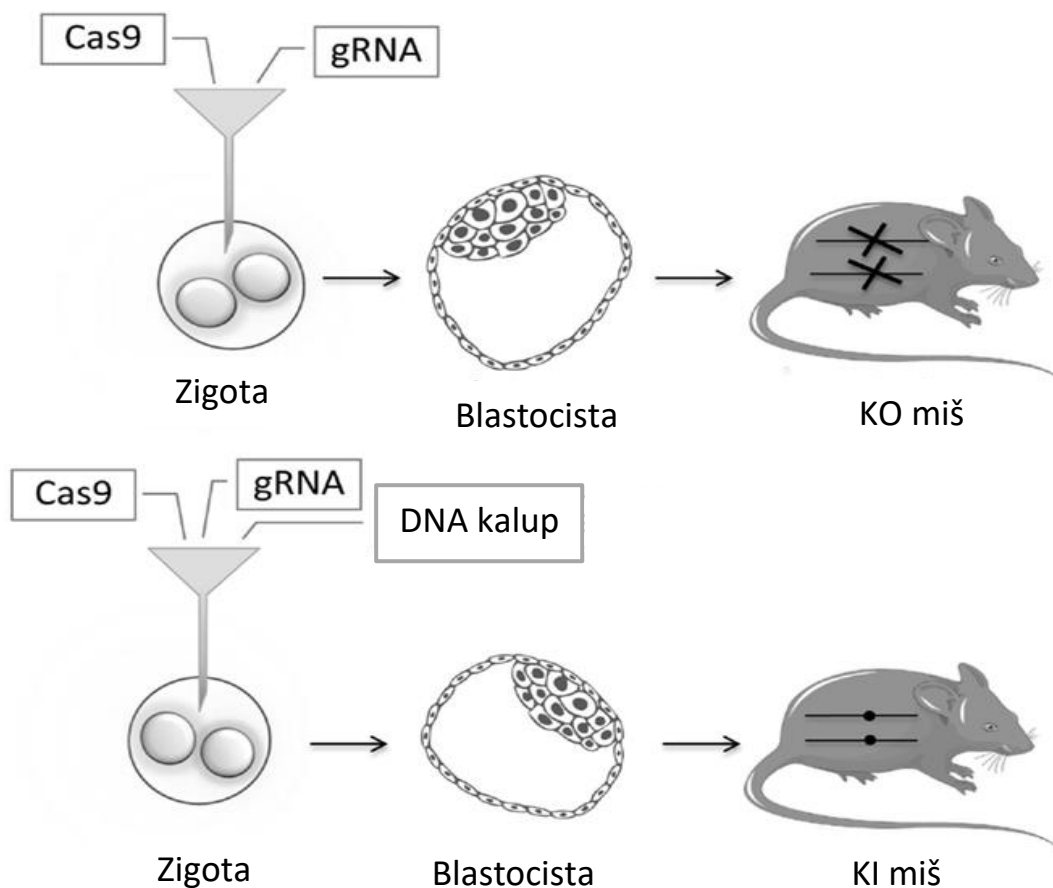
Najnovija i najbrža metoda ciljanog editiranja genoma današnjice sastoji se od primjene sustava CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic repeats/CRISPR associated protein 9*). Radi se o mehanizmu antivirusne obrane prisutnom u nekim bakterijama i većini arheja koji pohranjuje fragmente strane DNA duljine dvadesetak nukleotida i potom ih transkribira u crRNA (*crisprRNA*), koja se sastoji od virusnoj DNA homologne sekvence (*spacer*) na 5' kraju i ponavljajućeg elementa CRISPR lokusa (*repeat*) na 3' kraju. U kombinaciji s njome dolazi i kratka RNA molekula komplementarna s *repeat* sekvencom i koja s crRNA čini dvostruku hibridnu strukturu. Ta kratka RNA molekula nazvana je transaktivirajućom crRNA (*trans-activating crRNA*, tracrRNA). Ovaj kompleks dvaju RNA molekula navodi Cas endonukleazu na cijepanje stranoga genetskog materijala komplementarnog *spacer* sekvenci, primjerice virusne DNA, pri ponovnom susretu s njome

(Jiang i Doudna 2017; Wang i sur. 2016; Redman i sur. 2016). Za djelovanje Cas endonukleaze još je potrebno i prepoznavanje regije PAM (*protospacer adjacent motif*). Radi se o kratkom konzerviranom motivu duljine od 2 do 5 baza čija je točna sekvenca specifična za rod bakterije u kojemu Cas protein djeluje, a bez prepoznavanja PAM regije neće doći do cijepanja DNA. Taj je bakterijski sustav moguće iskoristiti u svrhu ciljanog uvođenja dvolančanih lomova u genom od interesa. Također, funkcije crRNA i tracrRNA u umjetnim sustavima objedinjene su u jednoj kimernoj molekuli sgRNA (*single guide RNA*) zbog jednostavnosti proizvodnje, s obzirom da se zadržava potpuna i neometana aktivnost Cas proteina (Jiang i Doudna 2017). Najčešće korišteni Cas protein upravo je Cas9, izoliran iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (Hall i sur. 2018). Kao i kod ZFN i TALEN, takvi lomovi zatim bivaju popravljani ili greškama sklonim mehanizmom NHEJ ili HDR, mehanizmom popravka visoke vjernosti prema homolognom kalupu. Prvi događaj rezultira kratkim insercijama i/ili delecijama, što dovodi do inaktivacije gena uslijed mutacije pomaka okvira čitanja, dok drugi može biti korišten za ugradnju raznih alela od interesa unutar pojedinog lokusa ili popravka nefunkcionalnog alela (Jiang i Doudna 2017).

Na slici 7. shematski je prikaz sustava CRISPR/Cas9, a na slici 8. njegova primjena u proizvodnji KO i KI miševa.



Slika 7. Shematski prikaz sustava CRISPR/Cas9. *Target DNA* označava genomsku DNA s genom od interesa koji biva izrezan. *guide RNA* (sgRNA) označava homolognu molekulu RNA čija je funkcija navođenje endonukleaze Cas9 na komplementarno mjesto označeno žuto. Narančasto je obojen dio sgRNA koji odgovara trans-aktivirajućoj crRNA u bakterijskom sustavu (tracrRNA) i koji s crRNA čini dvostruku hibridnu strukturu. PAM sekvenca označena je crvenom bojom.

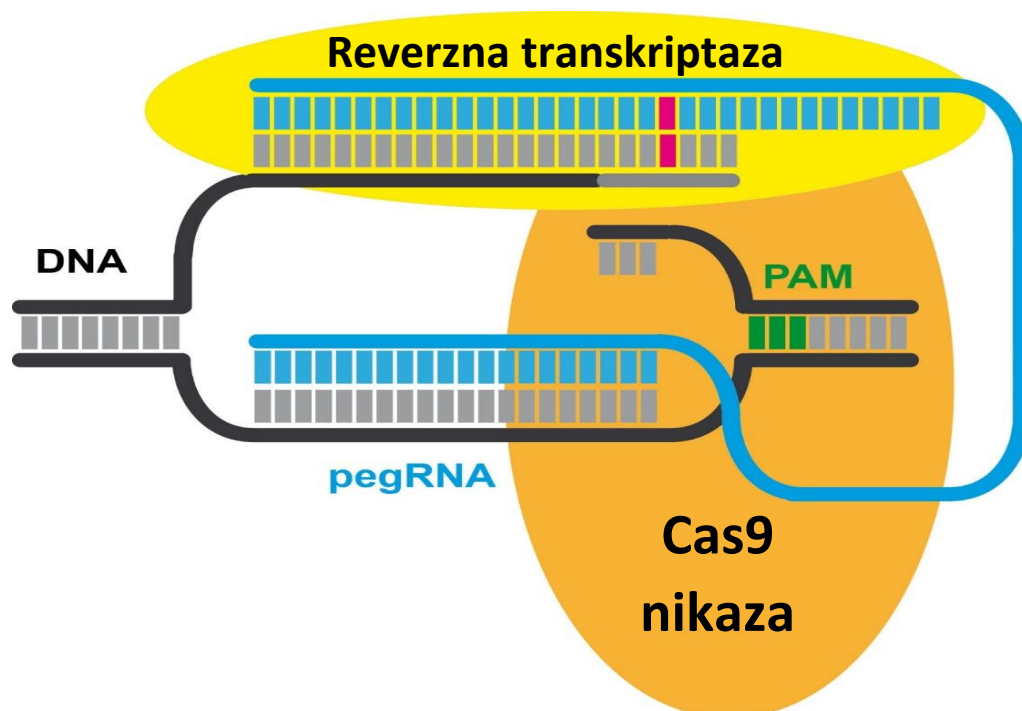


Slika 8. Shematski prikaz proizvodnje KO i KI miševa sustavom CRISPR/Cas9.

Mišje stanice su uz ljudske bile prve stanice sisavaca na kojima se istraživala mogućnost uređivanja genoma tehnologijom CRISPR/Cas9. Vrlo brzo se pokazala primjenjivost ove tehnologije za unos ciljanih promjena u genom uspješnim transformacijama mišjih i ljudskih stanica na Sveučilištu MIT (Cong i sur. 2013). Ubrzo je utvrđeno kako se radi i o daleko najbržoj metodi stvaranja mišjih KO linija, za što je potrebno oko četiri tjedna (Yang i sur. 2014). Nadalje, radi se i o daleko najspecifičnijoj metodi do sada, kojom je moguće postići inaktivaciju gena ograničenu na pojedino tkivo, primjerice mozak (Shinmyo i sur. 2016).

U odnosu na ZFN i TALEN, CRISPR/Cas9 sustav znatno je olakšao i pojednostavio postupak uvođenja promjena u genom zbog toga što je za uspješno navođenje sustava potrebno dizajnirati samo jednu sgRNA molekulu, za razliku od multimernih DNA vezujućih domena potrebnih u sustavima ZFN i TALEN (Hall i sur. 2018). Međutim, unatoč znatno većoj brzini i efikasnosti, postoji i veći rizik od nespecifičnih reakcija uslijed korištenja sgRNA. Naime dovoljno slična sekvenca duljine dvadesetak baza uz PAM može biti prisutna na više mjesta u genomu, što rezultira rezanjem DNA na krivom mjestu. Jedan od načina na koji se taj problem pokušao

riješiti je i korištenjem hibridne endonukleaze *FokI*-dCas9, koja se sastoji od nukleazne domene *FokI* i nefunkcionalne forme dCas9 (*dead Cas9*). Takav hibridni protein zahtijeva određenu udaljenost između sekvenci prepoznatih od sgRNA molekula, što povećava specifičnost restrikcije više od 140 puta u odnosu na divlji tip Cas9 (Hara i sur. 2015). Također, koliko god efikasnost transformacije sustavom CRISPR/Cas9 bila visoka, još je uvijek u nekim slučajevima nedovoljna. Pri proizvodnji mišjih KO embrija česta je pojava mozaicizma, tj. sve stanice nisu uspješno transformirane. Međutim, korištenjem više različitih sgRNA molekula specifičnih za pojedine eksone gena od interesa postigle su se stope efikasnosti od gotovo 100% (Zuo i sur. 2017). Korak dalje u odnosu na standardni CRISPR/Cas9 učinjen je razvitkom metode *prime editing*. Njena okosnica je nCas9 protein koji ima aktivnu samo jednu nukleaznu domenu. U kombinaciji s virusnom reverznom transkriptazom taj kompleks može uz pomoć pegRNA (*prime editing guide RNA*) u genom unijeti fine promjene na razini samo jednog nukleotida, bez dvolančanog loma i aktivacije mehanizma HDR. Takvu proceduru odlikuje praktički potpuno odsustvo nespecifičnih reakcija (Cohen 2019; Gao i sur. 2021). Sustav je već uspješno primijenjen u proizvodnji mišjih modela s tkivno specifičnim genskim mutacijama, poput onoga za X-vezani androgeni receptor (*Ar*) i *homeobox* protein Hox-D13 (*Hoxd13*) u N2A živčanim stanicama (Liu i sur. 2020). Shematski prikaz *prime editing* sustava prikazan je na slici 9.



Slika 7. Shematski prikaz prime editing sustava za unos točkaste mutacije, označene crvenim parom baza. pegRNA označena je plavom, a PAM mjesto zelenom bojom. Vidljivo je kako ne dolazi do dvolančanog loma, što omogućuje potpunu eliminaciju grešaka nastalih aktivacijom sustava HDR.

Naposljetku, korištenjem metode CRISPR/Cas9 na KO miševima moguće je *in vivo* promatrati terapijsku moć ovoga sustava, primjerice u tkivno specifičnom liječenju monogenских bolesti kao što je demonstrirano na mišjem modelu Duchenneove mišićne distrofije (Tabebordbar i sur. 2016).

5. Komercijalna proizvodnja KO miševa

Veliki broj linija KO miševa danas je komercijalno dostupan znanstvenicima diljem svijeta. Postoje brojne kompanije koje se bave proizvodnjom laboratorijskih miševa, što uključuje i KO miševe. Neke od svjetski renomiranih su *Charles River Laboratories* (<https://www.criver.com/>), *The Jackson Laboratory* (<https://www.jax.org/>), *Laboratory Corporation of America Holdings* (<https://labcorp.gcs-web.com/>), *Horizon Discovery Group plc* (<https://horizondiscovery.com/>), *Trans Genic Inc.* (<https://www.transgenic.co.jp/en/>), *genOway* (<https://www.genoway.com/>), *Taconic Biosciences Inc.* (<https://www.taconic.com/about-us/>) itd. Međutim, s obzirom da se radi o renomiranim tvrtkama s duljom povijesti poslovanja, njihove KO linije uglavnom se još uvijek dobivaju klasičnim metodama, posebice Cre/lox^P sustavom. Jedina iznimka je *Horizon Discovery Group plc*, britanska tvrtka locirana u Cambridgeu koja se, kao relativna novopridošlica na tržište KO miševa, okrenula proizvodnji svojih modela metodama koje uključuju ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9 (<https://meticulousblog.org/top-10-companies-in-mice-model-market/>).

6. Literatura

- Capecchi, M., 1989. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, 5, pp.70-76.
- Carroll, D., 2011. Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, 188(4), pp.773-782.
- Cermak, T., Doyle, E., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J., Somia, N., Bogdanove, A. and Voytas, D., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12), pp.e82-e82.
- Cohen, J., 2019. Prime editing promises to be a cut above CRISPR. *Science*, 366(6464), pp.406-406.
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. and Zhang, F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), pp.819-823.
- Evans, M., 1998. Gene trapping—a preface. *Developmental Dynamics*, 212(2), pp.167-169.
- Evans, M., Carlton, M. and Russ, A., 1997. Gene trapping and functional genomics. *Trends in Genetics*, 13(9), pp.370-374.
- Gaj, T., Gersbach, C. and Barbas, C., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), pp.397-405.
- Gao, P., Lyu, Q., Ghanam, A., Lazzarotto, C., Newby, G., Zhang, W., Choi, M., Slivano, O., Holden, K., Walker, J., Kadina, A., Munroe, R., Abratte, C., Schimenti, J., Liu, D., Tsai, S., Long, X. and Miano, J., 2021. Prime editing in mice reveals the essentiality of a single base in driving tissue-specific gene expression. *Genome Biology*, 22(1).
- Hall, B., Cho, A., Limaye, A., Cho, K., Khillan, J. and Kulkarni, A., 2018. Genome Editing in Mice Using CRISPR/Cas9 Technology. *Current Protocols in Cell Biology*, 81(1), p.e57.

- Hara, S., Tamano, M., Yamashita, S., Kato, T., Saito, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Inui, M. and Takada, S., 2015. Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9. *Scientific Reports*, 5(1).
- Jaenisch, R. and Mintz, B., 1974. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), pp.1250-1254.
- Jaenisch, R., 1977. Germ line integration of moloney leukemia virus: Effect of homozygosity at the M-MuLV locus. *Cell*, 12(3), pp.691-696.
- Jiang, F. and Doudna, J., 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), pp.505-529.
- Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Kazuki, Y., Lee, J., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A. and Shinohara, T., 2006. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), pp.8018-8023.
- Kieffer, B., 1999. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(1), pp.19-26.
- Kim, H., Kim, M., Im, S. and Fang, S., 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), p.147.
- Kim, Y., Cha, J. and Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), pp.1156-1160.
- Liu, Y., Li, X., He, S., Huang, S., Li, C., Chen, Y., Liu, Z., Huang, X. and Wang, X., 2020. Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discovery*, 6(1).
- Majzoub, J. and Muglia, L., 1996. Knockout Mice. *New England Journal of Medicine*, 334(14), pp.904-906.
- Müller, U., 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mechanisms of Development*, 82(1-2), pp.3-21.
- Orban, P., Chui, D. and Marth, J., 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), pp.6861-6865.

- Porteus, M. and Carroll, D., 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 23(8), pp.967-973.
- Redman, M., King, A., Watson, C. and King, D., 2016. What is CRISPR/Cas9?. *Archives of disease in childhood - Education & practice edition*, 101(4), pp.213-215.
- Roque, S., Nobrega, C., Appelberg, R. and Correia-Neves, M., 2007. IL-10 Underlies Distinct Susceptibility of BALB/c and C57BL/6 Mice to Mycobacterium avium Infection and Influences Efficacy of Antibiotic Therapy. *The Journal of Immunology*, 178(12), pp.8028-8035.
- Sauer, B., 1998. Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Methods*, 14(4), pp.381-392.
- Schnütgen, F., Hansen, J., De-Zolt, S., Horn, C., Lutz, M., Floss, T., Wurst, W., Noppinger, P. and von Melchner, H., 2008. Enhanced gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 36(20), pp.e133-e133.
- Shinmyo, Y., Tanaka, S., Tsunoda, S., Hosomichi, K., Tajima, A. and Kawasaki, H., 2016. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Scientific Reports*, 6(1).
- Skarnes, W., 1993. The identification of new genes: Gene trapping in transgenic mice. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(6), pp.684-689.
- Skarnes, W., 2005. Two ways to trap a gene in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37), pp.13001-13002.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J., Chew, W., Widrick, J., Yan, W., Maesner, C., Wu, E., Xiao, R., Ran, F., Cong, L., Zhang, F., Vandenberghe, L., Church, G. and Wagers, A., 2016. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*,
- Thomas, K. and Capecchi, M., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), pp.503-512. 351(6271), pp.407-411.
- Thompson, S., Clarke, A., Pow, A., Hooper, M. and Melton, D., 1989. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 56(2), pp.313-321.

Urnov, F., Rebar, E., Holmes, M., Zhang, H. and Gregory, P., 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), pp.636-646.

Vanhooren, V. and Libert, C., 2013. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews*, 12(1), pp.8-21.

Wang, H., La Russa, M. and Qi, L., 2016. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp.227-264.

Wasilczuk, A., Maier, K. and Kelz, M., 2018. The Mouse as a Model Organism for Assessing Anesthetic Sensitivity. *Methods in Enzymology*, pp.211-228.

Yang, H., Wang, H. and Jaenisch, R., 2014. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature Protocols*, 9(8), pp.1956-1968.

Zuo, E., Cai, Y., Li, K., Wei, Y., Wang, B., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., Hu, X., Wei, W., Huo, X., Shi, L., Tang, C., Liang, D., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Yao, X., Wang, X., Zhou, C., Ying, W., Wang, Q., Chen, R., Shen, Q., Xu, G., Li, J., Sun, Q., Xiong, Z. and Yang, H., 2017. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research*, 27(7), pp.933-945.

<https://www.cshl.edu/of-mice-and-model-organisms/> (pristup ostvaren 20.8.2021.)

<https://meticulousblog.org/top-10-companies-in-mice-model-market/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2007/summary/> (pristup ostvaren 21.8.2021.)

<https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research> (pristup ostvaren 20.8.2021.)

<https://www.genetargeting.com/knockout/knockout-mouse-made/> (pristup ostvaren 20.8.2021.)

<https://www.criver.com/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://www.jax.org/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://labcorp.gcs-web.com/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://horizondiscovery.com/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://www.transgenic.co.jp/en/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://www.genoway.com/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

<https://www.taconic.com/about-us/> (pristup ostvaren 30.8.2021.)

7. Sažetak

KO miševi jedan su od najvažnijih modelnih organizama za genetička istraživanja. Njihovim proučavanjem došlo se i dolazi do brojnih otkrića u pogledu funkcije gena, patologije bolesti, mehanizama genske regulacije i sličnog. Za neka otkrića koja su omogućila proizvodnju takvih organizama dodijeljena je i Nobelova nagrada. U ovom radu predstavljene su osnovne metode njihove proizvodnje uz pregled njihove efikasnosti. Klasične metode kreiranja *knockout* miševa nazivaju se *gene trapping* i *gene targeting*. *Gene trapping* sastoji se od nasumične ugradnje vektora s reporter genom u odabrani lokus genoma embrionalne matične stanice u kulturi s ciljem inaktivacije gena u tom lokusu. Tako transformirane matične stanice unose se u blastocistu i rezultiraju kimernim mišem, od kojega se povratnim križanjem dobiva KO miš. *Gene targeting* prva je metoda koja je omogućila ciljanu inaktivaciju gena. Također se provodi na embrionalnim matičnim stanicama u kulturi, a ugradnja se zasniva na homolognoj rekombinaciji između unešenog genetičkog materijala i lokusa od interesa. Najnovije metode transformiraju zigotu, što eliminira korak s kimernim mišem i povećava efikasnost proizvodnje, te skraćuje vrijeme koje je za nju potrebno. Te metode zasnivaju se na korištenju sustava ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9. ZFN i TALEN dizajnirane su endonukleaze koje specifično prepoznaju genske lokuse pomoću DNA vezujućih domena i uvode dvolančane lomove endonukleazom *FokI*. CRISPR/Cas9 koristi bakterijski antivirusni kompleks Cas9 navođen sgRNA molekulom koji također uvodi dvolančani lom. Najnovija varijanta naziva *prime editing* uključuje korištenje Cas9 proteina s nikaznom aktivnošću i gotovo potpuno eliminira nespecifične reakcije. Sustav CRISPR/Cas9 nudi do tada neviđen stupanj efikasnosti u uvođenju KO mutacija uz razmjerno jednostavan i jeftin postupak.

Ključne riječi: KO miševi, gene trapping, gene targeting, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9

8. Abstract

KO mice are one of the most important model organisms for genetic research. Their study has led to numerous discoveries regarding gene function, pathology of diseases, mechanisms of gene regulation and the like. For some discoveries that made it possible to produce such organisms, even the Nobel Prize was awarded. This paper presents the basic methods of their production with an overview of their efficiency. Classic methods of creating knockout mice are called gene trapping and gene targeting. Gene trapping consists of randomly embedding vectors with the reporter genome in the selected locus genome of embryonic stem cells in culture to inactivate genes in this locus. Thus, transformed stem cells are introduced into the blastocyst and result in a chimeric mouse, from which a KO mouse is obtained by reverse crossing. Gene targeting is the first method to enable targeted gene inactivation. It is also performed on embryonic stem cells in culture, and modification is based on homologous recombination between the entered genetic material and the locus of interest. The latest methods transform the zygote, which eliminates the step with the chimeric mouse and increases the efficiency of production, shortening the time required. These methods are based on the use of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 systems. ZFN and TALEN are artificial endonucleases that specifically recognize gene loci using DNA binding domains and introduce double-stranded breaks using endonuclease *FokI*. CRISPR/Cas9 uses the bacterial antiviral complex Cas9 guided by a sgRNA molecule that also introduces double-strand breaks. The latest method is named prime editing and involves the use of Cas9 proteins with nickase activity, almost completely eliminating nonspecific reactions. The CRISPR/Cas9 system offers an unprecedented degree of efficiency in introducing KO mutations with a relatively simple and inexpensive process.

Keywords: KO mice, gene trapping, gene targeting, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9

9. Životopis

Ime: Roko

Prezime: Gvozdenica Šipić

Datum rođenja: 13.8.1999.

Obrazovanje:

2006. – 2014. OŠ Mokošica

2014. – 2018. Klasična gimnazija Ruđera Boškovića s pravom javnosti Dubrovnik

2018. – 2021. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu

Dodatne aktivnosti:

2015. - 2018. polaznik tečaja iz biologije i kemije Udruge za promicanje prirodnih znanosti Dubrovnik

2020. – 2021. Rad na projektu za rektorovu nagradu pod imenom „Utjecaj toplinskog i solnog stresa na diploidni i poliploidni uročnjak (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)“