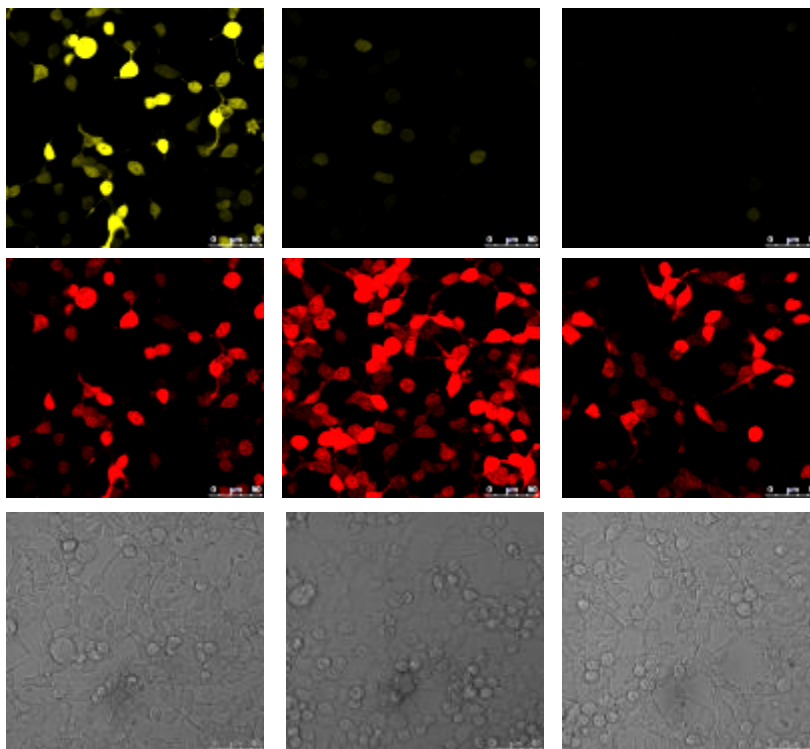




Mestna občina Celje
Komisija Mladi za Celje

Načrtovanje umetnih genskih omrežij

Raziskovalna naloga



Avtorici:

Ana Halužan Vasle, I. gimnazija v Celju
Ana Milovanović, I. gimnazija v Celju

Mentorici:

Tina Lebar,
L-12 (Laboratorij za biotehnologijo),
Kemijski inštitut, Ljubljana

mag. Mojca Alif
I. gimnazija v Celju

Celje, marec 2015

Zahvala

Zahvaljujeva se Kemijskemu inštitutu, ki nama je v okviru projekta Nova generacija raziskovalcev ved o življenju omogočil raziskovanje in uporabo laboratorijev ter opreme.

Iskrena hvala mentoricama Tini Lebar in mag. Mojci Alif, ki sta naju vseskozi potrpežljivo usmerjali in nama svetovali pri nastajanju raziskovalne naloge.

Hvala tudi prof. Vesni Gubenšek Bezgovšek za lektoriranje naloge.

Raziskovalna naloga je nastala v sklopu operacije Nova generacija raziskovalcev ved o življenju. Operacijo delno sofinancirata Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport. Operacija se izvaja v okviru *Operativnega programa razvoja človeških virov v obdobju 2007–2013*, 3. razvojne prioritete: »Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja«; prednostne usmeritve »3. 1. Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja«.



REPUBLIKA SLOVENIJA
**MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT**



**Kemijski inštitut
Ljubljana
Slovenija**



Povzetek

Celice lahko prepoznavajo različne signale, ki se prenašajo preko transkripcijskih faktorjev. Ti nadzorujejo izražanje genov. Z vnosom genov za transkripcijske faktorje lahko obnašanje celice spremenimo tako, da se odzove na natančno določen način, in tako ustvarjamo umetna genska omrežja. Modularne DNK-vezavne proteine lahko načrtujemo za vezavo na katero koli zaporedje DNK in tako pripravimo različne proteine s podobnimi biokemijskimi lastnostmi v skoraj neomejenem številu, kar omogoča lažje načrtovanje kompleksnih genskih omrežij.

Do danes so bili v ta namen že uporabljeni TAL efektorji, katerih pomanjkljivosti so velikost, draga in počasna sinteza ter metabolna obremenitev celice pri vstavljanju večjega števila TAL efektorjev. V raziskovalni nalogi smo kot alternativo rešitev preizkusili sistem CRISPR/Cas, ki deluje prek vezave majhnih RNK molekul na DNK. Dokazali smo, da sta si oba sistema po delovanju zelo podobna, saj lahko v isti celici kombiniramo RNK molekule za tarčno ciljanje več vezavnih mest hkrati.

Naši rezultati kažejo, da bi bil sistem CRISPR/Cas potencialno uporaben za sestavljanje kompleksnih umetnih genskih omrežij. Ta predstavljajo nove možnosti za usmerjeno celično terapijo, razvoj novih biosenzorjev ter potencialno uporabo v metabolnem inženiringu. Uporaba sistema CRISPR/Cas bi zmanjšala metabolne obremenitve spremenjenih celic in omogočila hitrejšo, cenejšo in učinkovitejšo optimizacijo ter uporabo velikega števila regulatornih elementov hkrati.

Abstract

Cells recognize various signals, transferred through proteins called transcription factors, which regulate gene expression. Artificial insertion of transcription factor genes can alter the behaviour of a cell for a specific response and therefore be used to create synthetic gene regulatory networks. Modular DNA binding proteins can be designed to bind to virtually any DNA sequence and therefore to prepare different proteins with similar biochemical properties in an almost indefinite number, which enables easier design of complex genetic networks.

TAL effectors have already been used for this purpose, but their main disadvantages are their size, expensive and slow synthesis and metabolic burden for the cell while inserting a vast number of TAL effectors. In this work, we tested the CRISPR/Cas system as an alternative solution to this problem. The system works through specific binding of small RNA molecules to a target DNA sequence. We have tested the specificity and efficiency of the CRISPR/Cas system in comparison with TAL effectors, which resulted in great similarity between both systems. Combining RNA molecules in a single cell for targeting multiple binding sites has provided significant evidence.

Our results demonstrate that the CRISPR/Cas system could potentially be used to construct synthetic gene regulatory networks. Such networks could provide new options for directed cell therapy, development of new biosensors and potential use in metabolic engineering. The use of the CRISPR/Cas system could decrease the metabolic burden of the engineered cells, which would result in more efficient optimization, a faster and cheaper assembly of complex biological systems and the use of a broad number of regulatory elements in a single cell.

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	4
1 Uvod.....	9
2 Teoretične osnove	9
2.1 Genska omrežja.....	9
2.1.1 Umetna genska omrežja	10
2.2 Transkripcijski faktorji.....	11
2.2.1 Genska omrežja na osnovi naravnih transkripcijskih faktorjev	12
2.2.2 Umetni transkripcijski faktorji.....	12
2.3 TAL efektorji	13
2.3.1 Zgradba in mehanizem delovanja	13
2.3.2 Umetni transkripcijski faktorji na osnovi TAL efektorjev	14
2.3.2.1 Umetna genska omrežja s TAL efektorji.....	15
2.4 CRISPR/Cas sistem.....	16
2.4.1 Mehanizem delovanja.....	16
2.4.2 Umetni transkripcijski faktorji na osnovi CRISPR/Cas sistema.....	17
2.5 Opredelitev problema	17
2.5.1 Cilji raziskovalne naloge	18
2.5.2 Delovne hipoteze.....	18
3 Materiali in metode.....	20
3.1 Materiali	20
3.1.1 Laboratorijska oprema.....	20
3.1.2 Kemikalije.....	20
3.1.3 Raztopine in pufri.....	21
3.1.4 Plazmidi	21
3.1.4.1 Uporabljeni promotorji	23
3.1.5 Organizmi	23
3.1.5.1 Bakterije.....	23
3.1.5.2 Človeške celične linije.....	23
3.1.6 Gojišča.....	23
3.2 Teoretične osnove metod in protokoli.....	24
3.2.1 Pomnoževanje plazmidov v celicah E. coli	24
3.2.2 Delo s celičnimi kulturami	26
3.2.3 Merjenje luciferazne aktivnosti.....	30
3.2.4 Fluorescentna mikroskopija.....	31
3.2.5 Pretočna citometrija.....	33
4 Rezultati	35
4.1 Delovanje CRISPR/Cas sistema	35
4.2 Učinkovitost CRISPR/Cas sistema	36
4.3 Primerjava učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev ...	37
4.4 Kinetika represije s TAL in CRISPR/Cas sistemom	39

4.5	Učinkovitost transkripcijske inhibicije z vezavo na različna DNK-vezavna zaporedja	40
4.6	Specifičnost vezave na predvideno DNK-vezavno zaporedje.....	41
4.7	Delovanje dveh RNK v isti celici	42
4.8	Načrtovanje genskih omrežij na osnovi CRISPR/Cas sistema.....	44
5	Razprava in sklepi.....	47
5.1	Razprava	47
5.1.1	Delovanje CRISPR/Cas sistema	47
5.1.2	Učinkovitost CRISPR/Cas sistema in optimizacija količin sgRNK	48
5.1.3	Primerjava učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev.....	48
5.1.4	Učinkovitost vezave različnih sgRNK molekul na tarčna DNK zaporedja	49
5.1.5	Specifičnost vezave različnih sgRNK na svoja prepoznavna zaporedja	50
5.1.6	Delovanje različnih sgRNK molekul v isti celici.....	50
5.1.7	Načrtovanje logičnih operacij s CRISPR/Cas sistemom.....	51
5.1.8	Omejitve sistema in možnosti izboljšave	51
5.1.9	Možnosti praktične uporabe umetnih genskih omrežij	52
5.1.10	Etični vidik uporabe gensko spremenjenih organizmov	53
6	Sklepi	54
7	Viri in literatura	55
7.1	Viri besedila.....	55
7.2	Viri slik.....	57
8	Priloge	59
8.1	Priloga A: Količine plazmidov, transfeciranih v posameznih eksperimentih	59
8.2	Priloga B: Protokoli	61
8.2.1	Protokol I: Pomnoževanje plazmidov v celicah E. coli.....	61
8.2.2	Protokol II: Delo s celičnimi kulturami.....	64
8.2.3	Protokol III: Merjenje luciferazne aktivnosti	66
8.2.4	Protokol IV: Fluorescentna mikroskopija	68
8.2.5	Protokol V: Pretočna citometrija.....	69

Kazalo slik

Slika 1: Shema genskega omrežja..	9
Slika 2: Priprava umetnih genskih omrežij..	10
Slika 3: Logična vrata so sestavljena iz več vhodnih signalov in enega izhodnega signala.	11
Slika 4: Zgradba TAL efektorjev.	14
Slika 5: Načrtovani TAL efektorji omogočajo kontrolo izražanja genov..	14
Slika 6: Biološka NOR vrata.....	15
Slika 7: Shema preklopne stikala na osnovi načrtovanih TAL efektorjev.....	15
Slika 8: Mehanizem delovanja sistema CRISPR/Cas..	16
Slika 9: Umetni transkripcijski faktorji na osnovi CRISPR/Cas sistema..	17
Slika 10: Plazmidna mapa komercialnega vektorja pcDNA3.....	22
Slika 11: Načrt poteka dela raziskovalne naloge.	24
Slika 12: Trdno gojišče z bakterijskimi kolonijami.	24
Slika 13: Spektrofotometer NanoDrop v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu	26
Slika 14: Graf absorbanca plazmidne DNK, izmerjen s spektrofotometrom NanoDrop.	26
Slika 15: Sterilno delo v laminariju.....	26
Slika 16: Gojitvena posodica za gojenje celičnih kultur.	27
Slika 17: Celice HEK293T, posnete s konfokalnim mikroskopom.	27
Slika 18: Naprava za avtomatsko štetje celic Countess™ v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitut v Ljubljani.....	28
Slika 19: Gojitvene plošče s 96, 12 in 8 luknjicami.	28
Slika 20: Shematski prikaz prehodne transfekcije.	29
Slika 21: Biokemijski reakciji, ki ju katalizirata kresničkina luciferaza (zgoraj) in <i>Renilla</i> luciferaza (spodaj)..	30
Slika 22: Merjenje luciferazne aktivnosti z luminometrom Orion.....	31
Slika 23: Shema fluorescentnega mikroskopa.	32
Slika 24: Fluorescentni konfokalni mikroskop v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.	32
Slika 25: Shema pretočnega citometra..	33
Slika 26: Pretočni citometer v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.....	34
Slika 27: Shema delovanja CRISPR Cas sistema..	35
Slika 28: Vezava testiranih transkripcijskih faktorjev na tarčno zaporedje.....	38
Slika 29: Primerjava učinkovitosti transkripcijske represije sistema CRISPR/Cas s TAL efektorji.....	38
Slika 30: Časovno spremljanje transkripcijske inhibicije s transkripcijskimi represorji na osnovi TAL efektorjev in CRISPR/Cas sistema..	39
Slika 31: Spremljanje transkripcijske inhibicije dveh poročevalskih proteinov z dvema različnima sgRNK v isti celici..	43
Slika 32: Shema NOR vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema..	44
Slika 33: Shema AND vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema..	45

Kazalo grafov

Graf 1: Preverjanje delovanja CRISPR/Cas sistema.	36
Graf 2: Odvisnost izražanja poročevalskega proteina od količine sgRNA.	37
Graf 3: Izražanje poročevalskega proteina v odvisnosti od časa..	40
Graf 4: Učinkovitost transkripcijske inhibicije poročevalskega gena kresničkine luciferaze ob vezavi transkripcijskih represorjev na osnovi CRISPR/Cas sistema oziroma TAL efektorjev na različna vezavna zaporedja.....	41
Graf 5: Specifičnost transkripcijske inhibicije poročevalskega gena z vezavo treh različnih sgRNK na različna DNK-vezavna mesta.....	42

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Naravni transkripcijski faktorji, pogosto uporabljeni za grajenje umetnih genskih omrežij.	12
Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema, navedena glede na proizvajalca.	20
Preglednica 3: Uporabljene kemikalije, navedene glede na proizvajalca.	20
Preglednica 4: Uporabljene raztopine in pufri s sestavinami.	21
Preglednica 5: Uporabljeni konstrukti.	22
Preglednica 6: Uporabljen bakterijski sev <i>E. coli</i> , genotip in vir.	23
Preglednica 7: Uporabljena celična linija z opisom in virom.	23
Preglednica 8: Uporabljena gojišča in njihova sestava.	24
Preglednica 9: Površina luknjice, število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče.	28
Preglednica 10: Število luknjic, maksimalna količina DNK in volumen transfekcijske mešanice za različne gojitvene plošče.	29
Preglednica 11: Oznake in nukleotidna zaporedja testiranih molekul sgRNA in TAL efektorjev.	40
Preglednica 12: Predvideno delovanje NOR logičnih vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema.	45
Preglednica 13: Predvideno delovanje AND logičnih vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema.	46
Preglednica 14: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja delovanja CRISPR/Cas sistema z merjenjem luciferazne aktivnosti (luc) in pretočno citometrijo (cit).	59
Preglednica 15: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih primerjave učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev, spremljanja kinetike transkripcijske inhibicije s fluorescentno mikroskopijo (mik.), pretočno citometrijo (cit.) ter merjenjem luciferazne aktivnosti (luc).	59
Preglednica 16: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja specifičnosti CRISPR/Cas sistema in primerjavi učinkovitosti transkripcijske represije z različnimi sgRNA.	59
Preglednica 17: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja specifičnosti in učinkovitosti več sgRNA molekul v isti celici s pretočno citometrijo.	60
Preglednica 18: Površina luknjice, število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče.	65
Preglednica 19: Število luknjic, maksimalna količina DNK in volumen transfekcijske mešanice za različne gojitvene plošče.	65

1 Uvod

Sintezna biologija je veda, katere cilj je preoblikovanje obstoječih bioloških sistemov za opravljanje novih nalog. Od preprostih naprav za nadzor aktivnosti posameznih genov so do danes znanstveniki prišli že do celotnih logičnih vezij in gradnje kompleksnih regulatornih omrežij.

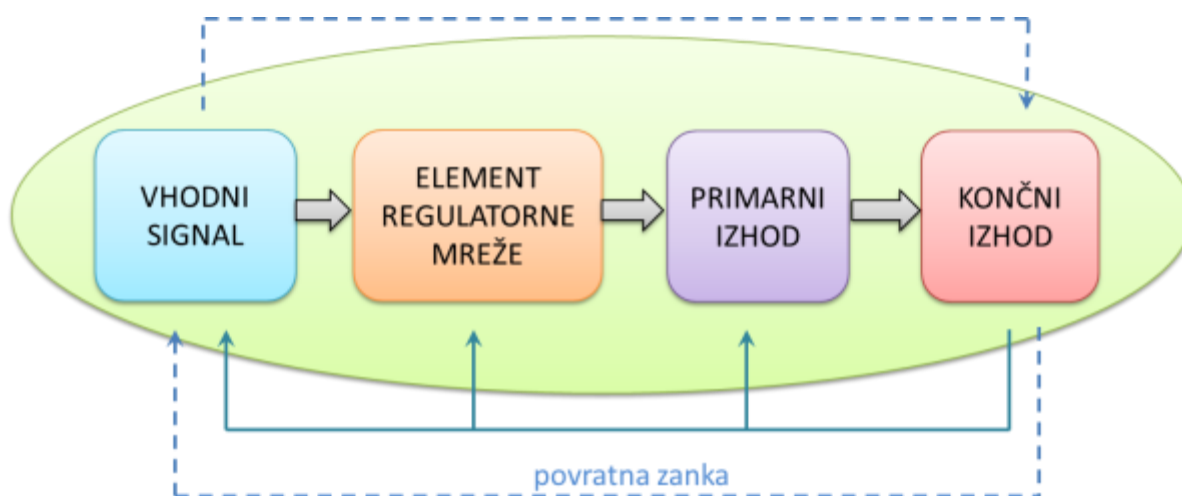
Logična vezja so sestavljena iz logičnih vrat, ki so zmožna pretvoriti enega ali več vhodnih signalov v izhodni signal. V elektronskih logičnih vratih vhodni signal predstavlja napetost oziroma tok, v bioloških logičnih vratih pa so vhodni signali različne molekule. Celice lahko prepoznajo te signale, ki se prenašajo preko proteinov, imenovanih transkripcijski faktorji. Ti nadzorujejo izražanje genov, vedenje celice pa lahko z vnosom genov za transkripcijske faktorje spremenimo tako, da se odzove na natančno določen način.

Umetna genska omrežja so potencialno uporabna predvsem za medicinske aplikacije, na primer za kontrolirano dostavo zdravil, diferenciacijo celic in biosenzorje. Možnosti uporabe se raztezajo tudi na druga področja, na primer v okoljskih aplikacijah (biosenzorji) in v metabolnem inženiringu.

2 Teoretične osnove

2.1 Genska omrežja

Genska regulatorna omrežja so v naravi prisotna v vsaki celici. Elementi celice (DNK, RNK in proteini) interagirajo drug z drugim in s tem nadzorujejo celične procese. Določen signal (»vhod«) prek elementov regulatornega omrežja sproži zaporedje reakcij, ki povzroči spremenjeno delovanje celice ali njenih delov (»izhod«). Skoraj vsak fenotip je posledica delovanja regulatornih mrež oziroma kompleksnega uravnavanja izražanja genov. Običajno so prisotne tudi povratne zanke, ki zagotovijo celični spomin (1).



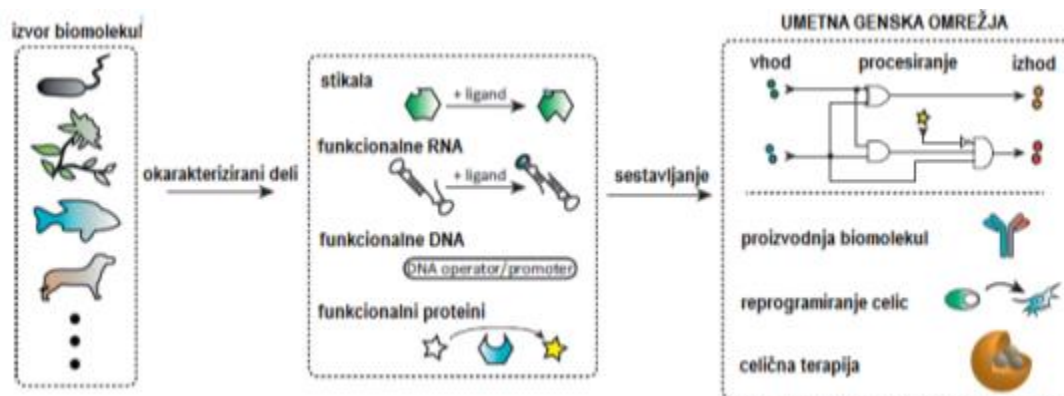
Slika 1: Shema genskega omrežja

Genska omrežja sestavljajo elementi celice, ki interagirajo drug z drugim in nadzorujejo celične procese, največkrat na nivoju transkripcije oziroma translacije. Vhodni signal prek teh elementov sproži zaporedje reakcij, ki povzroči spremenjeno delovanje celičnih komponent – primarni izhod, kar se na koncu kaže v spremenjenem obnašanju ali spremenjeni strukturi celice – končni izhod (shema pripravila: Ana Halužan Vasle).

Če celoten proces poenostavimo, ga lahko primerjamo z delovanjem računalnika – gre za procesiranje informacij v bioloških sistemih. Vhodni signali v bioloških logičnih vratih so različne molekule (2, 3), informacija pa se nato namesto po žicah prenaša preko proteinov – transkripcijskih faktorjev (4). Ti nadzorujejo izražanje genov, kar se odraža v spremenjenem obnašanju ali strukturi celice (izhodni signal).

2.1.1 Umetna genska omrežja

Sintezna biologija nam s pomočjo zahtevnejšega genskega inženiringa omogoča ustvarjanje organizmov s povsem novimi funkcijami, uporabnimi za človeka⁴. Na ta način so bila do danes ustvarjena različna genska omrežja, ne le v bakterijskih, pač pa tudi v sesalskih celicah⁵. Iz preprostih naprav za nadzor aktivnosti posameznih genov in proteinov je znanstvenikom uspelo ustvariti celotna logična vezja in kompleksnejša regulatorna omrežja (4).



Slika 2: Priprava umetnih genskih omrežij

Biološke molekule izvirajo iz različnih organizmov. Masovno sekveniranje¹ genomov omogoča čedalje boljše karakterizacijo bioloških delov iz organizmov. Danes tako poznamo ogromno različnih funkcionalnih RNK, DNK in proteinskih molekul, ki jih lahko sestavljamo v umetna genska omrežja. Ta so potencialno uporabna za izboljšanje proizvodnje različnih znanih ali novih biomolekul (npr. protitelesa), reprogramiranje celic in celo za celično terapijo (povzeto po 3).

Biološka logična vrata so naprave, ki izvajajo logične operacije in imajo enega ali več vhodnih ter en izhodni signal. Takšna logična vrata so bila do danes že večkrat pripravljena v bakterijskih (6, 7) in sesalskih celicah (8, 10) ter so dobra osnova za grajenje kompleksnejših omrežij.

¹ Določanje nukleotidnega zaporedja.



Slika 3: Logična vrata so sestavljena iz več vhodnih signalov in enega izhodnega signala

Vhodni signali so v bioloških sistemih različne molekule, ki prek nadzora transkripcije, translacije ali celo post-translacijskih procesov povzročijo spremenjen odziv celice, izražen kot izhodni signal (shemo pripravila Ana Halužan Vasle).

Naprednejši sistemi so preklopna stikala, ki celici omogočajo zaznavanje in prilagajanje vhodnim signalom. Najpreprostejše biološko stikalo je sistem dveh represorskih proteinov, ki uravnavata transkripcijo drug drugega. Prvo preklopno stikalo (11), realizirano v bakteriji *Escherichia coli*, je bilo ob dodatku ustrezne induktorske molekule sposobno zavzeti dve različni stanji. Podobna stikala so na osnovi bakterijskih transkripcijskih faktorjev kasneje pripravili v sesalskih celicah (12).

Leta 2000 je bil izdelan biološki oscilator, sestavljen iz treh transkripcijskih represorjev, ki zavirajo transkripcijo drug drugega (13). Liho število elementov je onemogočilo stabilnost in povzročilo nihanja (oscilacije) v izražanju posameznih represorskih elementov. Biološki oscilatorji na osnovi različnih elementov so bili kasneje večkrat realizirani v bakterijskih sistemih (14, 15), pred kratkim pa tudi v sesalskih celicah (16, 17).

2.2 Transkripcijski faktorji

Transkripcijski faktorji so proteini, ki nadzorujejo izražanje genov. Sestavljeni so iz DNK vezavne domene, odgovorne za prepoznavanje vezavnega zaporedja na molekuli DNK in vezavo nanj, ter efektorske domene, ki omogoči aktivacijo ali inhibicijo transkripcijske aktivnosti. Med najbolj razširjene DNK vezavne motive štejemo cinkove prste, levcinske zadrge, motive vijačnica-zanka-vijačnica in homeodomene (vijačnica-zavoj-vijačnica)³.

Efektorske domene določajo funkcijo transkripcijskega faktorja – ali bo aktiviral oziroma zaviral transkripcijo (18). Inhibicija transkripcije je mogoča tudi z vezavo same DNK vezavne domene na 3' konec promotorskega zaporedja. To prepreči vezavo RNK polimeraze in posledično nastajanje mRNK.

Transkripcijske faktorje lahko pripravimo tudi umetno, s fuzijo različnih DNK vezavnih domen z efektorskimi domenami. Najpogosteje uporabljeni efektorski domeni sta domena KRAB², ki transkripcijo zavira, in domena VP16³ (oziroma njen tetramerni derivat VP64), ki

² ang. »Krüppel associated box«

transkripcijo aktivira. Domena KRAB transkripcijo prepreči z utišanjem kromatina (19), medtem ko jo domena VP16 aktivira s spodbujanjem sestavljanja iniciacijskega kompleksa (20).

2.2.1 Genska omrežja na osnovi naravnih transkripcijskih faktorjev

Eden prvih sintetičnih transkripcijskih faktorjev za uporabo v sesalskih celicah je bil rezultat združitve represorskega proteina TetR in aktivacijske domene VP16 (21). Znanstveniki so do danes povečali repertoar sintetičnih transkripcijskih faktorjev na osnovi naravnih bakterijskih proteinov, ki jih je mogoče uravnati z različnimi ligandi (npr. antibiotiki in drugi metaboliti) (3). Nekateri pogosto uporabljeni naravni transkripcijski faktorji so povzeti v Preglednici 1.

Preglednica 1: Naravni transkripcijski faktorji, pogosto uporabljeni za grajenje umetnih genskih omrežij
Prav tako sta navedena izvorni organizem in majhna molekula, ki povzroči disociacijo proteina z DNK (povzeto po 3).

Ime	Funkcija	Izvor	Ligand
E. REX	bakterijski transkripcijski represor	<i>E. coli</i>	eritromicin
LacI	bakterijski represorski protein	<i>E. coli</i>	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
PIT	bakterijski transkripcijski represor (Pip)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	pristinamicin, virginiamicin
TET	bakterijski transkripcijski represor (TetR)	<i>E. coli</i>	tetraciklin, doksiciklin
AraC	bakterijski transkripcijski represor	<i>E. coli</i>	L-arabinoza
CI	bakteriofagni transkripcijski represor	Enterobacteria phage λ	toplota

2.2.2 Umetni transkripcijski faktorji

Do sedaj uporabljeni transkripcijski faktorji izvirajo iz različnih bioloških sistemov, zato morajo biti dobro preučeni za lažje predvidevanje njihovega obnašanja v kompleksnih sistemih. Ti faktorji so vpleteni v nadzor različnih procesov in interagirajo z drugimi molekulami. Bakterijski transkripcijski faktorji so na voljo v omejenem številu – poleg zgoraj omenjenih (Preglednica 1) poznamo še nekaj slabše okarakteriziranih. Priprava kompleksnejših umetnih bioloških sistemov je s pomočjo razpoložljivih elementov torej nerealna.

Modularne DNK vezavne domene, za katere je značilen način prepoznavanja DNK, omogočajo načrtovanje proteinov za vezavo na skoraj katero koli nukleotidno zaporedje (3, 4). Z dodajanjem efektorskih domen lahko ustvarimo nove umetne transkripcijske faktorje.

³ ang. »Herpes simplex virus protein« in ang. »virion protein 16«

Transkripcijski faktorji na osnovi podobnih DNK vezavnih domen imajo podobne biokemijske lastnosti, kar omogoča robustnost in lažje razumevanje dinamike načrtovanih genskih sistemov. Z možnostjo načrtovanja DNK vezavnih domen se izognemo morebitni vezavi na genomsko DNK gostiteljskih celic in vmešavanju v endogene celične procese (22).

Cinkovi prsti predstavljajo velik nabor dostopnih, specifičnih DNK vezavnih domen (23). Dolgo so veljali za najbolj uporabne pri načrtovanju umetnih transkripcijskih faktorjev (24), vendar je bilo ugotovljeno, da jih kljub vsemu ne moremo z gotovostjo načrtovati za vezavo na poljubno DNK zaporedje zaradi vpliva sosednjih prstov na prepoznavanje posameznih baznih parov (25). Boljša možnost za pripravo umetnih transkripcijskih faktorjev so pred nekaj leti odkriti TAL efektorji (podrobneje opisani v poglavju 2.3) – v zadnjem času v ospredje vse bolj prihaja sistem CRISPR/Cas (podrobneje opisan v poglavju 2.4).

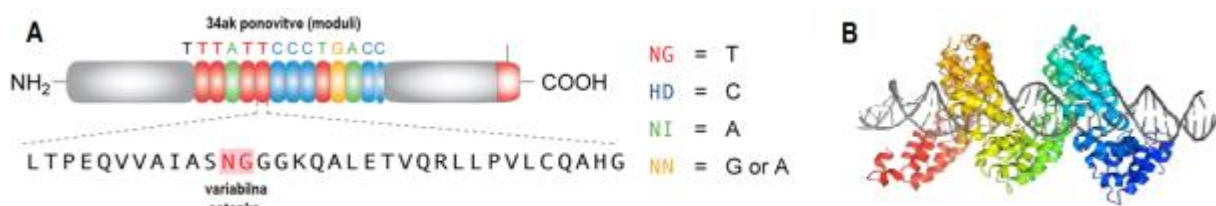
2.3 TAL efektorji

TAL efektorji so nedolgo nazaj odkriti DNK vezavni proteini, ki izvirajo iz bakterij rodu *Xanthomonas* spp. Te jih izločajo v svoje rastlinske gostitelje in tam sprožijo transkripcijo onkogenov²⁶.

2.3.1 Zgradba in mehanizem delovanja

TAL efektorji so sestavljeni iz več modulov, vsak izmed teh pa vsebuje 33–35 aminokislinskih ostankov. Moduli se med seboj razlikujejo le v dveh ostankih, na pozicijah 12 in 13 (RVD⁴ – ostanka, ki variirata s ponovitvijo). Ta aminokislinska ostanka sta odgovorna za specifičnost vezave enega modula na natančno določen nukleotid (27).

⁴ ang. »repeat variable residue«



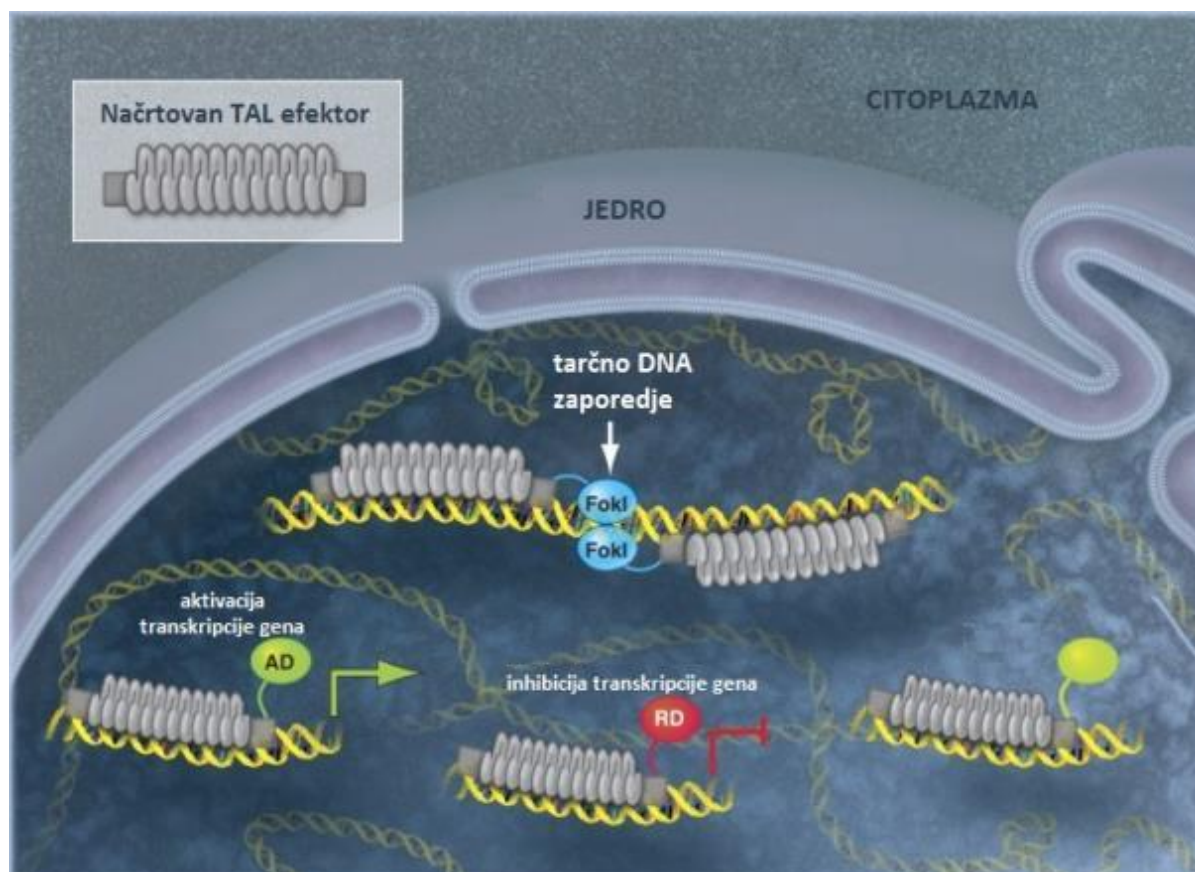
Slika 4: Zgradba TAL efektorjev

A) Znotrajmolekularna sestava TAL efektorjev. Sestavljeni so iz več modulov iz ponovitev okrog 34 aminokislin, od katerih v vsakem modulu variirata le aminokislini na pozicijah 12 in 13. Ti določata specifično vezavo na en nukleotid. Na desni strani so navedeni aminokislinski ostanki za vezavo na specifičen nukleotid (povzeto po http://taleffectors.genome-engineering.org/wp-content/uploads/2011/02/tale_rvd1.png).

B) Tridimenzionalna struktura TAL efektorja, vezanega na molekulo DNK (povzeto po 26).

2.3.2 Umetni transkripcijski faktorji na osnovi TAL efektorjev

TAL efektorji v osnovi vsebujejo domeno za aktivacijo transkripcije v rastlinah (27), ki jo lahko zamenjamo z drugimi efektorskimi domenami. Z njimi lahko razrežemo izbrano DNK zaporedje (nukleaze) (28, 29) ali pa izražanje želenega gena aktiviramo (npr. domena VP16) (30, 31) oziroma zavremo (npr. domena KRAB) (22, 32).



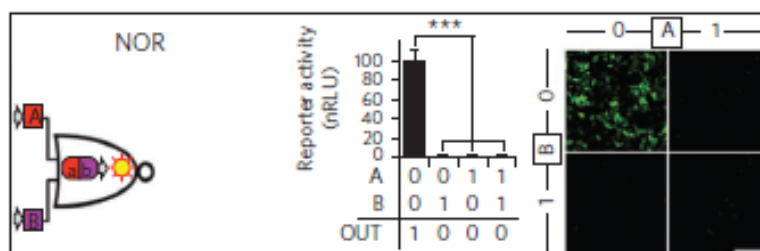
Slika 5: Načrtovani TAL efektorji omogočajo kontrolo izražanja genov

S fuzijo TAL efektorjev in endonukleaze FokI lahko pripravimo za natančno določeno zaporedje specifične nukleaze, ki molekulo DNK na izbranem mestu razrežejo. To omogoča izbijanje genov in načrtovano spreminjanje genomske DNK. Z dodatkom aktivacijskih domen lahko ustvarimo za zaporedje specifične

transkripcijske aktivatorje, dodatek represorskih domen pa omogoči pripravo za zaporedje specifičnih transkripcijskih represorjev (27).

2.3.2.1 Umetna genska omrežja s TAL efektorji

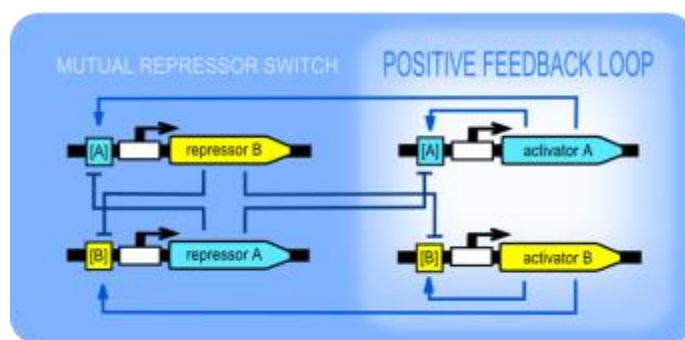
Zaradi svoje specifičnosti, učinkovitosti in možnosti načrtovanja za vezavo na katero koli DNK zaporedje predstavljajo transkripcijski faktorji na osnovi TAL efektorjev odlične elemente za grajenje kompleksnih genskih omrežij. Sodelavci Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu so letos izdelali biološka NOR vrata na osnovi TAL represorjev v sesalskih celicah⁹. S povezovanjem več NOR vrat so pripravili vseh 16 logičnih funkcij z dvema vhodnima signaloma.



Slika 6: Biološka NOR vrata

Vhoda predstavljata TAL efektorja z oznakama A (rdeča) in B (vijolična), ki se vežeta na svoji prepoznavni zaporedji pred poročevalskim genom (izhod). S tem dosežemo izražanje poročevalskega gena le v odsotnosti obeh vhodov, kar ustreza logiki NOR vrat. S kombiniranjem NOR vrat lahko sestavimo katera koli dvovhodna logična vrata (povzeto po 3).

Leta 2012 je slovenska ekipa študentov v okviru tekmovanja iGEM izdelala preklopno stikalo na osnovi načrtovanih TAL transkripcijskih faktorjev (33). Stikalo sta sestavljala dva TAL represorja, ki zavirata transkripcijo drug drugega, ter dva TAL aktivatorja, ki tvorita pozitivno povratno zanko. Stikalo je sposobno zavzeti dve različni stabilni stanji in med njima kontrolirano preklapljati.



Slika 7: Shema preklopnega stikala na osnovi načrtovanih TAL efektorjev

Transkripcijska represorja zavirata transkripcijo drug drugega, medtem ko aktivatorja tvorita pozitivno povratno zanko in ojačata stabilnost (povzeto po

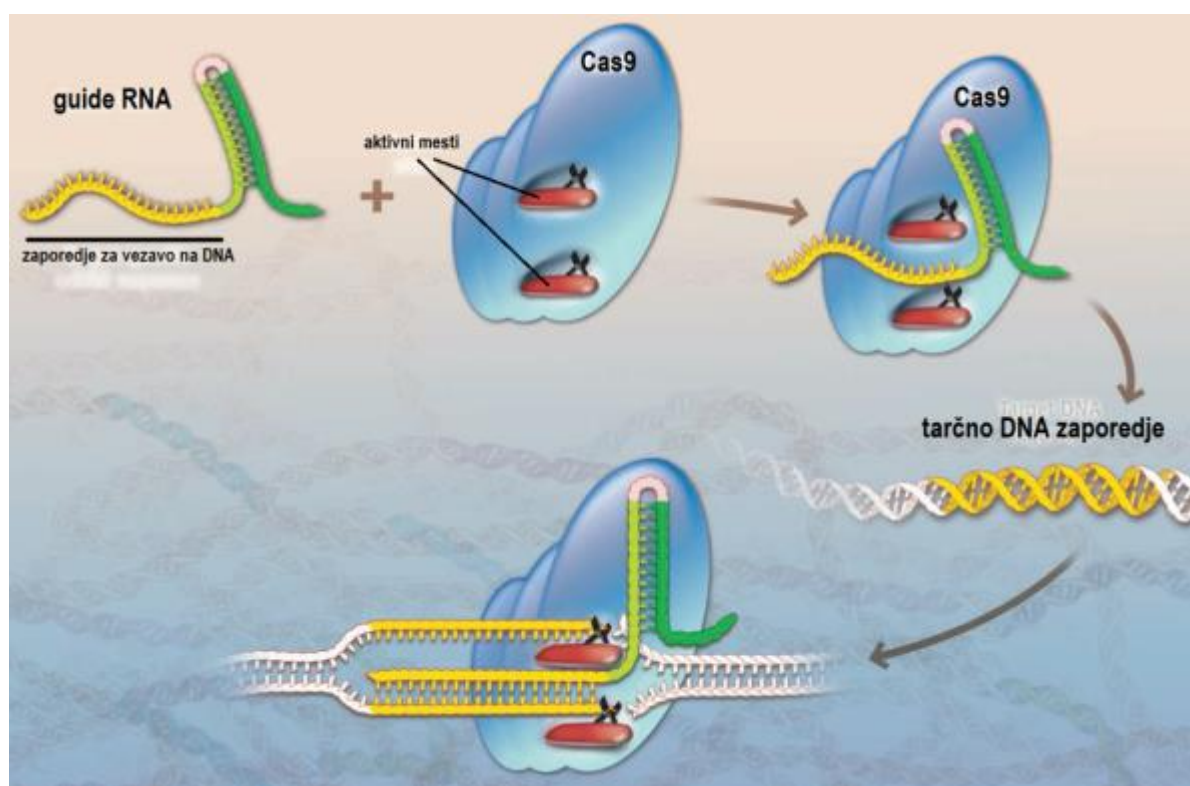
http://2012.igem.org/wiki/images/6/67/Svn12_thwswitch_switch7%281%29.png).

2.4 CRISPR/Cas sistem

Sistem CRISPR/Cas so odkrili že pred nekaj desetletji kot del bakterijske obrambe proti virusom (34). Gre za od RNK odvisno DNK endonukleazo Cas9. Sistem so leta 2013 prvič uporabili za tarčno ciljanje DNK zaporedja, s čimer je CRISPR/Cas doživel preboj v sintezni biologiji (35).

2.4.1 Mehanizem delovanja

CRISPR/Cas preko vezane molekule RNK »poišče« tarčno zaporedje, kjer tvori kompleks RNK : DNK. Za vezavo na DNK je potrebno še mesto PAM⁵, ki se nahaja na 5` koncu tarčnega DNK zaporedja in ga sestavljajo trije nukleotidi (NGG). Nukleaza Cas9 molekulo DNK razcepi (34, 36, 37) na mestu vezave.



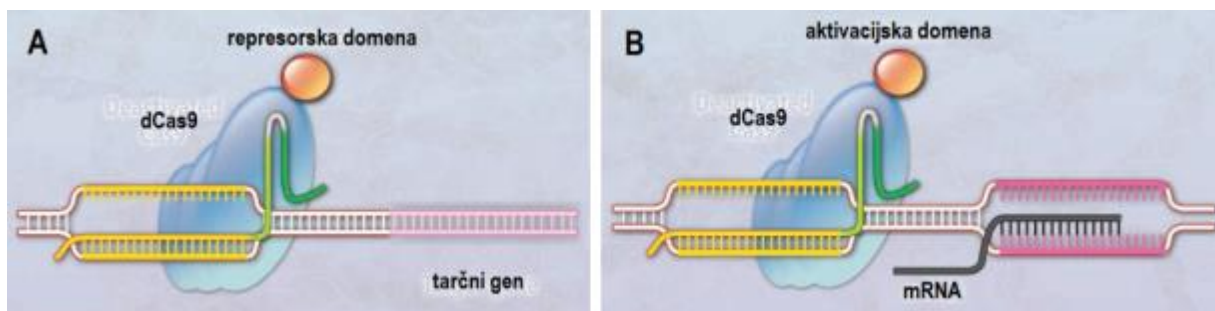
Slika 8: Mehanizem delovanja sistema CRISPR/Cas

Molekula *guide* RNK se veže v kompleks z encimom Cas9. Ta se nato veže na tarčno DNK zaporedje prek dela molekule RNK, specifičnega za vezavo. Encim Cas9 na mestu vezave molekulo DNK razcepi (povzeto po 37).

⁵ ang. »Protospacer Adjacent Motif«

2.4.2 Umetni transkripcijski faktorji na osnovi CRISPR/Cas sistema

S spreminjanjem dela RNK za vezavo na DNK lahko sistem CRISPR/Cas uporabimo za tarčno cepitev genomske DNK. Z mutacijo v katalitično aktivnem mestu nukleaze Cas9 lahko pripravimo nukleolitično neaktiven encim dCas9⁶. Ta molekule DNK ne prereže, še vedno pa ohrani sposobnost vezave RNK, kar omogoča tarčno ciljanje specifičnih DNK zaporedij. Z dodatkom represorskih oziroma aktivacijskih domen na dCas9 lahko pripravimo umetne transkripcijske faktorje (35, 38, 39).



Slika 9: Umetni transkripcijski faktorji na osnovi CRISPR/Cas sistema

A) Inaktivirani obliki encima Cas9 (dCas9) lahko dodamo represorsko domeno. Takšen encim se v odvisnosti od RNK veže na molekulo DNK, vendar je tam ne razcepi, temveč zavre transkripcijo tarčnega gena.

B) Inaktivirani obliki encima Cas9 (dCas9) lahko dodamo aktivacijsko domeno. Pridobljen encim se v odvisnosti od RNK veže na molekulo DNK, je ne razreže, marveč spodbudi transkripcijo tarčnega gena (povzeto po 37).

2.5 Opredelitev problema

Kompleksnejši biološki sistemi zahtevajo veliko število učinkovitih, dobro okarakteriziranih in specifičnih transkripcijskih faktorjev, ki ne vplivajo na osnovne celične procese. Dobro okarakteriziranih transkripcijskih faktorjev je malo in izvirajo iz različnih bioloških sistemov – zato imajo različne biokemijske lastnosti, lahko pa interagirajo tudi z drugimi molekulami v celici.

Modularne DNK vezavne proteine, npr. cinkove prste ali TAL efektorje, lahko načrtujemo za vezavo na katero koli tarčno zaporedje, s čimer lahko pripravimo različne DNK vezavne proteine v skoraj neomejenem številu. S takšnimi proteini se izognemo možnosti vezave na genomsko DNK gostiteljskih celic in vmešavanju v endogene celične procese. Opisani DNK vezavni proteini imajo zelo podobne biokemijske lastnosti, ki omogočajo lažje načrtovanje in razumevanje kompleksnih genskih omrežij.

Če takšnim DNK vezavnim proteinom dodamo efektorske domene, dobimo umetne transkripcijske faktorje. Sodelavci Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu so,

⁶ ang. »dead Cas9«

kot že veliko drugih raziskovalnih skupin, pred kratkim pripravili umetne transkripcijske faktorje na osnovi TAL efektorjev. Pokazali so, da se ti transkripcijski faktorji specifično in učinkovito vežejo na svoja prepoznavna zaporedja ter jih zaradi teh lastnosti lahko uporabimo za izvedbo zahtevnejših logičnih funkcij z večjim številom elementov. Žal pa so TAL efektorji veliki modularni proteini, zaradi česar je priprava genov za nove transkripcijske faktorje draga in počasna. Poleg tega se DNK zaporedja znotraj genov ponavljajo, zato obstaja velika možnost rekombinacije.

2.5.1 Cilji raziskovalne naloge

Drugo možnost načrtovanja umetnih transkripcijskih faktorjev predstavlja sistem CRISPR/Cas⁷, ki temelji na DNK endonukleazi⁸ Cas9. Ta se v prisotnosti majhnih RNK molekul (sgRNK) veže na specifično zaporedje DNK in molekulo na tistem mestu razcepi. S spreminjanjem zaporedja za vezavo na RNK molekuli lahko CRISPR/Cas uporabljamo za tarčno ciljanje poljubnega DNK zaporedja. Nukleazno aktivnost proteina Cas9 je mogoče zavreti in s tem preprečiti rezanje DNK. Že več raziskovalnih skupin je pokazalo, da lahko encimu Cas9 z inaktivirano nukleazno aktivnostjo dodamo efektorske domene in tako inhibiramo (npr. z domeno KRAB) oziroma aktiviramo (npr. z domeno VP16) transkripcijo želenega gena.

Prednost zgoraj predstavljenega sistema je hitra in cenejša sinteza elementov za vezavo na različna tarčna zaporedja, saj so molekule RNK kratke. Poleg tega sinteza majhnih RNK molekul predstavlja za celico manjšo metabolno obremenitev kot sinteza velikih proteinov (TAL efektorji).

Zadani cilj raziskovalne naloge je preverjanje ustreznosti CRISPR/Cas sistema za uporabo pri načrtovanju in grajenju umetnih genskih omrežij v človeški celični liniji HEK293T. Preizkusili bomo delovanje sistema CRISPR/Cas z inhibicijsko domeno KRAB in ga primerjali z delovanjem TAL efektorjev. Primerjali bomo tudi učinkovitost transkripcijske inhibicije in specifičnost vezave na tarčno zaporedje.

Na podlagi predhodnih raziskav predvidevamo, da se bodo transkripcijski faktorji, osnovani na CRISPR/Cas sistemu, izkazali kot primerni elementi za grajenje umetnih genskih omrežij.

2.5.2 Delovne hipoteze

Na podlagi že znanih dejstev predpostavljamo, da je učinkovitost in specifičnost sistema CRISPR/Cas primerljiva s TAL efektorji in posledično uporabna pri načrtovanju kompleksnejših genskih omrežij.

⁷ ang. »Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats«

⁸ Restriksijski encim, ki razreže DNK na specifičnih mestih nukleotidnih zaporedij.

- Hipoteza 1:** Inaktivirana endonukleaza dCas9, spojena s KRAB domeno, se veže na DNK zaporedje v odvisnosti od prisotnosti majhnih RNK molekul.
- Hipoteza 2:** Učinkovitost sistema CRISPR/Cas je primerljiva s TAL efektorji.
- Hipoteza 3:** Sistem CRISPR/Cas lahko uporabimo za načrtovanje kompleksnejših genskih omrežij.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Laboratorijska oprema

Vsa uporabljena laboratorijska oprema se nahaja v Laboratoriju za biotehnologijo (L-12) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema, navedena glede na proizvajalca

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Berthold	Orion II Microplate luminometer z računalniškim programom Simplicity 4.2
Binder	inkubator za celične kulture
Corning	plošče s 96 luknjicami, posodice za multikanalno pipeto
Eppendorf	termoblok Thermomixer R, namizna centrifuga MiniSpin, avtomatske pipete, nastavki za pipete
Euromax	invertni svetlobni mikroskop
Gilson	avtomatske pipete
Golias	petrijevke
Hettich	centrifuga Universal 320R
Ibidi	mikroskopične komore z 8 luknjicami
IKA	vrtničnik Lab dancer
Invitrogen	naprava za avtomatsko štetje celic Countess, števne komore
Iskra-PIO	laminarij M18
Leica MICROSYSTEMS	konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 z računalniškim programom Leica LAS AF Lite
LTH	hladilnik
Nalgene	stojalo za mikrocentrifugirke
New Brunswick Scientific	inkubator za bakterijske kulture Innova® 42
Partec	pretočni citometer CyFlow
Sanyo	skrinja za -80 °C
Sarstedt	nastavki za pipete
Schott Duran	steklovina
Thermo Scientific	spektrometer NanoDrop ND-1000
TPP	centrifugirke, plošče z 12 luknjicami, gojitvene posodice, serološke pipete
Zanussi	zmrzovalnik (-20 °C)

3.1.2 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije smo dobili v Laboratoriju za biotehnologijo (L-12) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Preglednica 3: Uporabljene kemikalije, navedene glede na proizvajalca

Proizvajalec	Kemikalije
Carlo Erba	NaF
Gibco	DMEM (GlutaMAX™-I), toplotno inaktivirani fetalni goveji serum (FBS)
Goldbio	ampicilin
Inalco	DTT
Invitrogen	tripan modro
Merck	MgCl ₂ , NaCl, etanol, metanol, agar-agar
Molecular Probes	coelenterazin
Promega	Luciferin, 5xLysis buffer
Sigma-Aldrich	gojišče LB po Millerju, kanamicin sulfat, CoA, ATP, DMSO, HEPES, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , CDTA, EGTA, Na pirofosfat, KCl, PEI

3.1.3 Raztopine in pufri

Pri delu smo uporabljali raztopine in pufre, navedene v Preglednici 4.

Preglednica 4: Uporabljene raztopine in pufri s sestavinami

Raztopina/pufer	Sestavine
fLuc-pufer	5xLUC pufer: 16,6mM HEPES, 3,33mM MgCl ₂ , 0,08 mM EGTA·Na, dH ₂ O do primerne volumna; pH 7,8, dodatek 1,67mM NaF. 2,6 mL 5xLUC pufra + 130 µl DTT (16,67 mM) + 130 µl ATP (0,44 mM) + 130 µl CoA (0,23 mM) + MQ do 13 mL. Luciferin (0,39 mM) raztopimo v 100 µl DMSO in ga dodamo pufru.
Renilla-pufer	2xREN pufer: 7,5mM Na pirofosfat 50mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 250mM NaCl, 5mM CDTA 0,01 % (v/v) metanol (0,01 l/l); dH ₂ O do primerne volumna; pH 5,0 6,5 mL 2xREN pufra + MQ do 13 mL. Coelenterazin (0,001 mM) raztopimo v 100 µl metanola in ga dodamo pufru.
10x PBS	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,5 g KH ₂ PO ₄ , MQ do 1 L; pH 7,4.
NaCl za pripravo transfekcijskih mešanic	150 mM NaCl
raztopina transfekcijskega reagenta PEI	

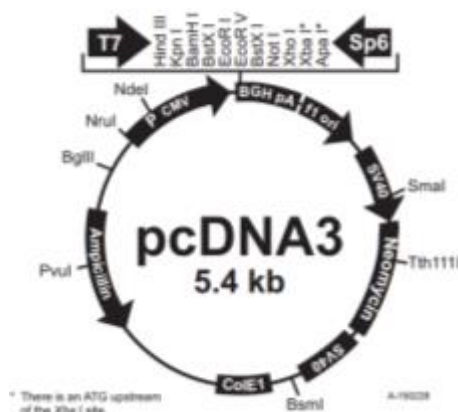
3.1.4 Plazmidi

Vse plazmide, navedene v Preglednici 4, smo dobili v Laboratoriju za biotehnologijo (L-12) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Vsi genski konstrukti (z izjemo *Renilla* luciferaze v komercialnem vektorju phRL-TK) so vstavljeni v poliklonsko mesto komercialnega vektorja pcDNA3 (sesalski ekspresijski vektor) na 3' konec promotorja CMV.

DNK zaporedja, ki kodirajo sgRNA molekule, so v vektor vstavljena tako, da ta ne vsebuje več CMV promotorja, temveč promotor mU6.

Vezavna mesta za TAL efektorje oziroma sgRNA so v poročevalske plazmide vstavljena na 5' konec CMV promotorja. Nukleotidna zaporedja vezavnih mest so navedena v Preglednici 11.



Slika 10: Plazmidna mapa komercialnega vektorja pcDNA3 (Invitrogen)

Preglednica 5: Uporabljeni konstrukti

Oznaka konstrukta	Opis konstrukta
pCMV-TALA:KRAB	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo TAL efektorja A z 2x jedrnim lokalizacijskim signalom in KRAB represijsko domeno na C-terminalnem koncu.
pCMV-TALB:KRAB	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo TAL efektorja B z 2x jedrnim lokalizacijskim signalom in KRAB represijsko domeno na C-terminalnem koncu.
pCMV-TALD:KRAB	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo TAL efektorja D z 2x jedrnim lokalizacijskim signalom in KRAB represijsko domeno na C-terminalnem koncu.
p-CMV-dCas9:KRAB	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo nukleolitično neaktivne endonukleaze dCas9 z 2x jedrnim lokalizacijskim signalom in s KRAB represijsko domeno na C-terminalnem koncu.
mU6-sgRNA-A	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo sgRNK, ki se veže na vezavno mesto [a].
mU6-sgRNA-B	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo sgRNK, ki se veže na vezavno mesto [b].
mU6-sgRNA-D	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo sgRNK, ki se veže na vezavno mesto [d].
7[a]-pCMV-fLuc	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega proteina kresničkine luciferaze v odsotnosti proteina TALA:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-A. 7 ponovitev vezavnih mest [a] je vstavljenih na 5' konec CMV promotorja.
7[b]-pCMV-fLuc	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega proteina kresničkine luciferaze v odsotnosti proteina TALB:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-B. 7 ponovitev vezavnih mest [b] je vstavljenih na 5' konec CMV promotorja.
7[d]-pCMV-fLuc	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega proteina kresničkine luciferaze v odsotnosti proteina TALD:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-D. 7 ponovitev vezavnih mest [d] je vstavljenih na 5' konec CMV promotorja.
7[b]-pCMV-mCit	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega fluorescentnega proteina mCitrine v odsotnosti proteina TALB:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-B. 7 ponovitev vezavnih mest [b] je vstavljenih na 5' konec CMV promotorja.
7[d]-pCMV-mCit	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega fluorescentnega proteina mCitrine v odsotnosti proteina TALD:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-D. 7 ponovitev vezavnih mest [d] je vstavljenih na 5' konec CMV promotorja.
7[a]-pCMV-TagBFP	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo poročevalskega fluorescentnega proteina BFP v odsotnosti proteina TALA:KRAB oziroma odsotnosti proteina dCas9:KRAB in majhne RNK molekule sgRNA-A.
pCMV-mCherry	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo fluorescentnega proteina mCherry. Uporabili smo ga za normalizacijo nivoja transfekcije v eksperimentih, kjer smo

	uporabljali konfokalno mikroskopijo.
pCMV-iRFP	Plazmid zagotavlja konstitutivno ekspresijo fluorescentnega proteina iRFP. Uporabili smo ga za normalizacijo nivoja transfekcije v eksperimentih, kjer smo uporabljali pretočno citometrijo.
pTK-rLuc	Plazmid phRL-TK (Promega), ki zagotavlja konstitutivno ekspresijo <i>Renilla</i> luciferaze. Uporabili smo ga za normalizacijo nivoja transfekcije v eksperimentih s kresničkino luciferazo kot poročevalskim genom.

3.1.4.1 Uporabljeni promotorji

Uporabljali smo promotorja CMV in mU6, ki sta natančneje opisana v nadaljevanju.

CMV⁹ je konstitutivni sesalski promotor, ki močno dvigne ekspresijske nivoje konstitutivnih proteinov. Učinkovito spodbuja ekspresijo v velikem številu različnih celic.

mU6 je mišji U6 snRNK promotor. RNK iz U6 promotorjev ne prepisuje RNK polimeraza II (kot npr. mRNK, iz katere nastanejo proteini), temveč RNK polimeraza III. Pridobljene majhne RNK se v proteine ne prevedejo. Promotor vsebuje klonirno mesto, ki dovoljuje vstavljanje kratkih RNK za prvim nukleotidom U6 promotorskega zaporedja.

3.1.5 Organizmi

3.1.5.1 Bakterije

Plazmide smo namnožili v celicah bakterij *E. coli* (sev DH5 α).

Preglednica 6: Uporabljen bakterijski sev *E. coli*, genotip in vir

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F'/supE44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1, relA1</i>	Zbirka sevov KI

3.1.5.2 Človeške celične linije

Vse nadaljnje eksperimente smo izvedli v človeški celični liniji HEK293T.

Preglednica 7: Uporabljena celična linija z opisom in virom

Celična linija	Opis	Vir
HEK293T	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic z vstavljenim velikim SV40 antigenom T	Carsten Kirschning (Tehniška Univerza München)

3.1.6 Gojišča

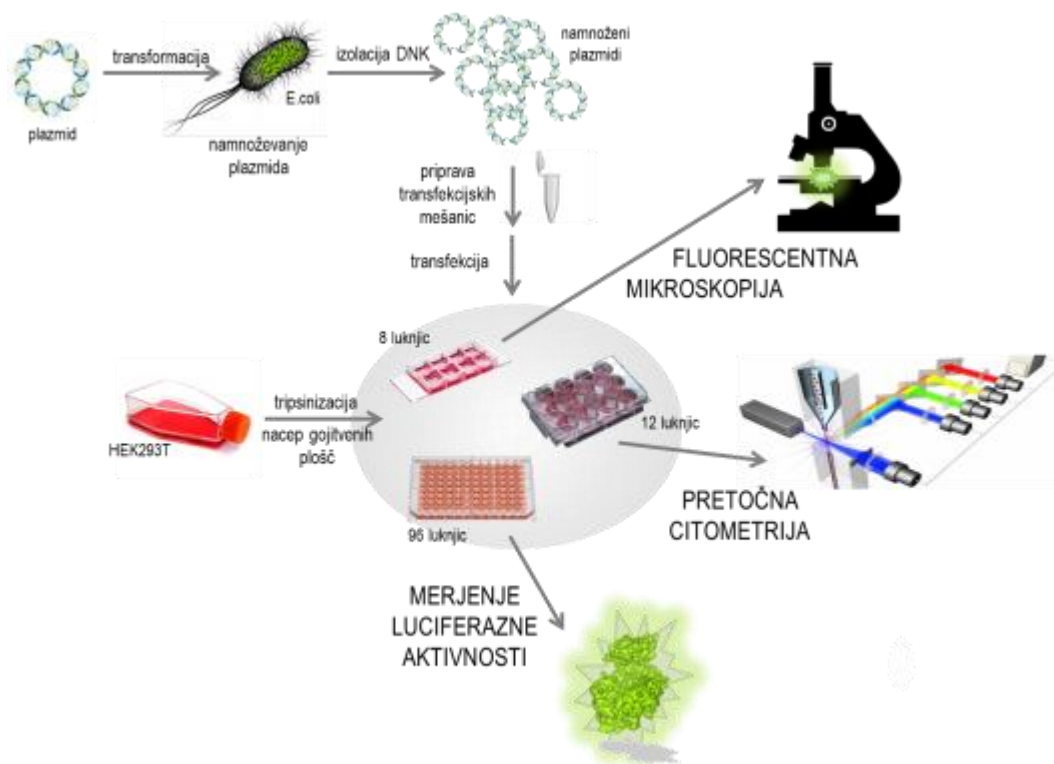
Seve bakterije *E. coli* smo gojili v tekočem in na trdnem LB gojišču. Za gojenje celične linije HEK293T smo uporabili gojišče DMEM (»Dulbecco's modified Eagle medium«) z dodanim 10 % FBS (fetalni goveji serum).

⁹ ang. »cytomagalovirus«

Preglednica 8: Uporabljena gojišča in njihova sestava

Ime gojišča	Sestava
Tekoče LB gojišče	25 g/l LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt)
Trdno LB gojišče	25 g/l LB (10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g kvasni ekstrakt)
	15 g/l agar
Gojišče za celične kulture	0,5 l DMEM
	55 ml FBS

3.2 Teoretične osnove metod in protokolov

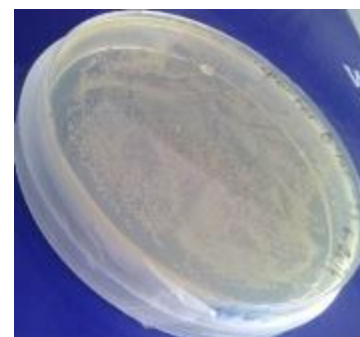


Slika 11: Načrt poteka dela raziskovalne naloge

3.2.1 Pomnoževanje plazmidov v celicah E. coli

Plazmidi so pomembna orodja v biotehnologiji, saj lahko z njihovo pomočjo v različnih organizmih (bakterije, kvasovke, sesalske celične linije ...) izrazimo določene gene. Plazmide največkrat pomnožujemo v bakterijskih celicah. Za ta proces mora plazmid vsebovati mesto začetka pomnoževanja DNK in gen za odpornost na antibiotik. S postopkom transformacije plazmide vnesemo v bakterijske celice. Toplotni šok spodbudi odpiranje por v membrani in pospešeno prejemanje plazmidov.

Prisotnost ustreznega antibiotika v gojišču predstavlja selekcijski pritisk, ki omogoči rast le bakterijam, ki so plazmid prejele, in hkrati prepreči izločanje plazmida iz celice, saj je pomnoževanje



Slika 12: Trdno gojišče z bakterijskimi kolonijami (foto: Ana Halužan Vasle)

plazmidov za bakterije energijsko potratno.

Kompetentne celice *E. coli* DH5 α , shranjene na -80 °C, smo odtalili na ledu in 100 ng izbranih plazmidov odpipetirali v označene mikrocentrifugirke s celicami. Po približno 30 minutah inkubacije na ledu smo izvedli toplotni šok na 42 °C (2 minuti). Celicam smo dodali 1 ml tekočega LB gojišča. Sledila je enourna inkubacija na 37 °C s stresanjem pri 500 rpm. Nato smo celice centrifugirali 3 minute pri 7000 rpm. Odlili smo večino gojišča, v mikrocentrifugirkah ga je ostalo le približno 100 μ l. Pelet celic smo resuspendirali in prenesli na agarno gojišče. S hokejko smo razmazali celice na trdna LB gojišča z ustreznim antibiotikom in jih inkubirali na 37 °C do naslednjega dne.

Tekočemu LB gojišču (10 ml) smo dodali 10 μ l ustreznega antibiotika (ampicilin ali kanamicin) s koncentracijo 50 mg/ml. Agarno ploščo s transformiranimi bakterijami smo odprli in se z nastavkom za pipeto dotaknili ene kolonije. Nastavek smo odvrgli v tekoče gojišče in ga zaprli. Agarna gojišča smo zatesnili s parafilmom in vrnili v hladilnik, tekoča pa postavili v stresalnik na 37 °C in 160 rpm.

DNK smo izolirali s kitom Nippon Genetics Fast Gene™ Plasmid Mini Kit. Postopek temelji na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNK na nosilec. Izolacijo smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca.

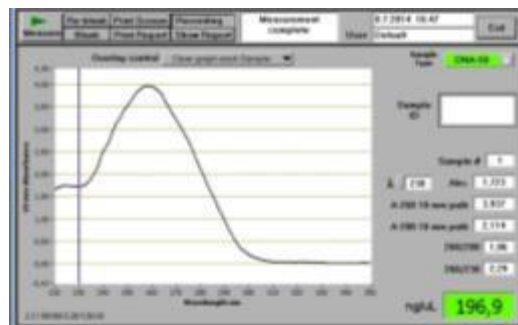
Po približno 16 urah inkubacije smo preverili, če so se bakterije v tekočih gojiščih namnožile. To opazimo kot zadostno motnost gojišč. Njihovo vsebino smo prelili v označene centrifugirke, ki smo jih centrifugirali 2 minuti pri 12000 rpm. Supernatant smo odlili, na dnu je ostal le pelet bakterijskih celic. Nadaljnje postopke smo izvedli po navodilih komercialnega kita.

Spektrofotometrija temelji na merjenju količine absorbirane svetlobe pri prehodu skozi vzorec. Naprava pošlje žarek svetlobe skozi raztopino vzorca in na drugi strani z detektorjem meri intenziteto svetlobe. Nukleinske kisline, proteini in nekatere druge biološke molekule absorbirajo svetlobo v UV spektru, zato lahko spektrofotometrijo izkoriščamo za merjenje njihovih koncentracij. Nukleinske kisline imajo najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 260nm.

Koncentracijo izoliranih plazmidov smo preverili na spektrofotometru NanoDrop, ki smo ga upravljali s pripadajočim računalniškim programom. Najprej smo spektrofotometer kalibrirali z vzorcem MQ, nato pa nanj odpipetirali vzorec brez DNK za določitev ničelne točke. Po vsakem vzorcu smo vzorčno točko NanoDropa očistili, nanесли 1 μ l novega vzorca in izmerili koncentracije izoliranih plazmidov.



Slika 13: Spektrofotometer NanoDrop v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu (foto: Ana Milovanović)



Slika 14: Graf absorbance plazmidne DNK, izmerjen s spektrofotometrom NanoDrop (foto: Ana Milovanović)

3.2.2 Delo s celičnimi kulturami

Delo s celičnimi kulturami poteka v laboratoriju druge varnostne stopnje. Pri delu nosimo zaščitne 'copatke', ki si jih povežemo prek čevljev, zaščitno kapo, rokavice in takšnemu delu posebej namenjeno haljo. Delo poteka sterilno v laminariju, njegovo površino in vse pripomočke pred začetkom dodatno steriliziramo s 70 % etanolom.

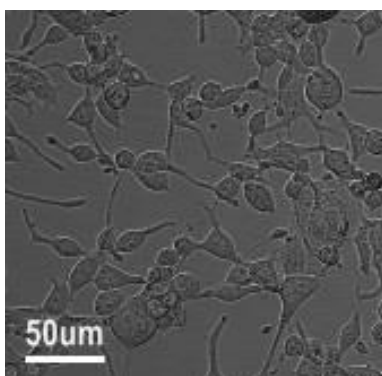


Slika 15: Sterilno delo v laminariju (foto: Ana Milovanović)

Celična linija HEK293T¹⁰ izvira iz človeških ledvičnih embrionalnih celic in je oblika celic HEK293. Od slednjih se razlikuje v vsebnosti SV40 Large T-antigena, ki omogoča podvajanje transfeciranih plazmidov. To dovoljuje podaljšan čas izražanja zelenih genskih produktov. HEK293T je zaradi enostavnega gojenja in možnosti za transfekcijo z različnimi metodami zelo razširjena.

Opisano celično linijo smo gojili v inkubatorju na 37 °C pri kontrolirani atmosferi s 5 % CO₂.

Gojenje je potekalo v gojitvenih posodah, prevlečenih s polistirenom, ki celicam omogoča pritrjanje na podlago in rast v enem sloju.



Slika 17: Celice HEK293T, posnete s konfokalnim mikroskopom (foto: Ana Halužan Vasle)



Slika 16: Gojitvena posodica za gojenje celičnih kultur (vir: <http://www.celprogen.com/image/cache/d ata/imgs/T75%20Flask-500x500.jpg>)

HEK293T se prilepijo na površino gojitvene posodice, zato jih je potrebno pred nacepljanjem v gojitvene plošče odlepiti. To storimo z encimom tripsin, ki razgradi proteine, s katerimi so celice pritrjene na podlago.

S serološko pipeto smo odstranili gojišče in celice nežno sprali s 5 ml PBS ter ga po tem odstranili iz gojitvene posodice. Dodali smo 2 ml tripsina in gojitveno posodico nekajkrat nežno zazibali, da so se celice odlepile s površine. Dodali smo 10 ml gojišča (DMEM + 10 % FBS), ki inhibira tripsin, in celice resuspendirali. Suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in jih centrifugirali 5 minut pri 1200 rpm. Iz centrifugirke smo odstranili gojišče, ga nadomestili z 10ml svežega (DMEM + 10 % FBS) in celice s pipeto nežno resuspendirali. 10 % suspenzije celic smo vrnili v gojitveno posodico, ki smo jo predhodno sprali s 5 ml PBS. Preostanek suspenzije celic smo uporabili za nacep na gojitvene plošče.

¹⁰ ang. »Human Embryonic Kidney 293T cells«

Število nacepljenih celic je odvisno od velikosti luknjic na gojitvenih ploščah, zato je potrebno celice pred nacepom prešteti. Zanima nas le število živih celic, zato jih pred štejetjem obarvamo z modrim barvilom tripan, ki prehaja samo skozi membrane mrtvih celic.

10 μ l modrega barvila tripan smo dodali 10 μ l suspenzije celic. V pripravljeno števno komoro smo odpipetirali 10 μ l obarvanih celic in jo vstavili v napravo za avtomatsko štetje celic Countess. Ta rezultat poda v celokupnem številu celic/ml, odstotku viabilnosti ter številu mrtvih in živih celic. Za nadaljnje računanje smo uporabili zgolj število živih celic.



Slika 18: Naprava za avtomatsko štetje celic CountessTM v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitut v Ljubljani (foto: Ana Milovanović)

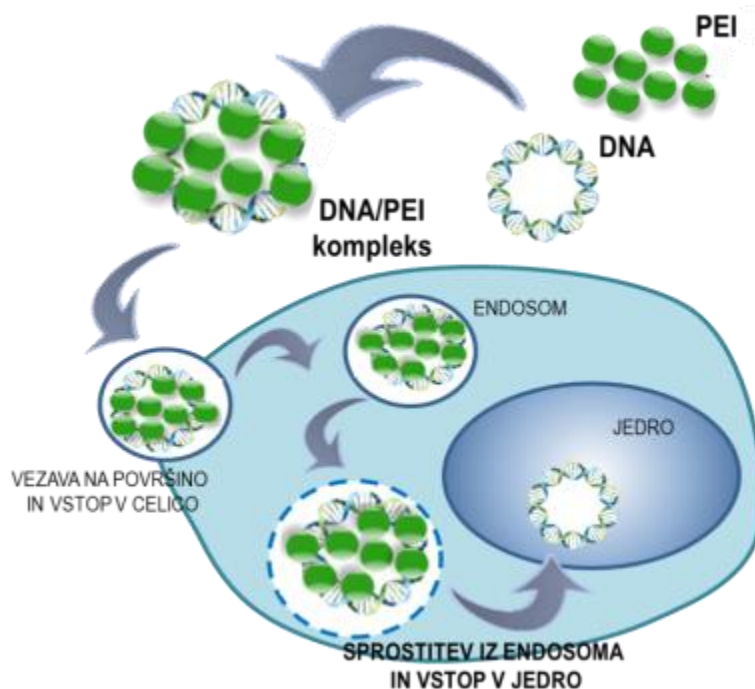
Preglednica 9: Površina luknjice, število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče

Število luknjic	Površina luknjice [cm ²]	Število celic/luknjico	Volumen gojišča/luknjico [ml]
8	1	100000	0,25
12	3,8	250000	1
96	0,14	50000	0,1

Označili smo prazne gojitvene plošče in v sterilni plastični posodici zmešali izračunane volumne gojišča in celic. Ustrezne volumne smo prenesli v luknjice gojitvenih plošč.



Slika 19: Gojitvene plošče s 96, 12 in 8 luknjicami (foto: Ana Milovanović)



Slika 20: Shematski prikaz prehodne transfekcije

V sesalske celice gene vnašamo s procesom transfekcije. Ta je lahko stabilna, pri čemer izbrana DNK zaporedja s pomočjo virusov vgradimo v genom gostiteljske celice, ali pa prehodna. Slednja je uporabljena pogosteje, z njo pa v gostiteljske celice vnašamo plazmidne vektorje. Poznamo več metod prehodne transfekcije – med fizikalne spadata na primer elektroporacija ali mikroinjiciranje, med kemijske pa vnos s pomočjo koprecipitacije kalcijevega fosfata, vnos z liposomi ali pa vnos s transfekcijskimi reagenti na osnovi kationskih lipidov.

Za transfekcijo smo uporabili reagent polietilenimin (PEI). PEI DNK kondenzira v pozitivno nabite delce, ki se vežejo na površino celice in vstopijo z endocitozo.

Približno 24 ur po nacepu celic v ustrezne gojitvene plošče smo izvedli prehodno transfekcijo. Pripravili smo načrt in izračunali potrebne volumne plazmidov na podlagi števila paralelk ter založne koncentracije plazmidov. Te smo zmešali v ustreznem volumnu 150mM NaCl, kar je približna fiziološka koncentracija soli.

Preglednica 10: Število luknjic, maksimalna količina DNK in volumen transfekcijske mešanice za različne gojitvene plošče

Število luknjic	Maksimalna količina DNK [ng]	Volumen transfekcijske mešanice [μl]
8	500	50
12	2000	100
96	250	20

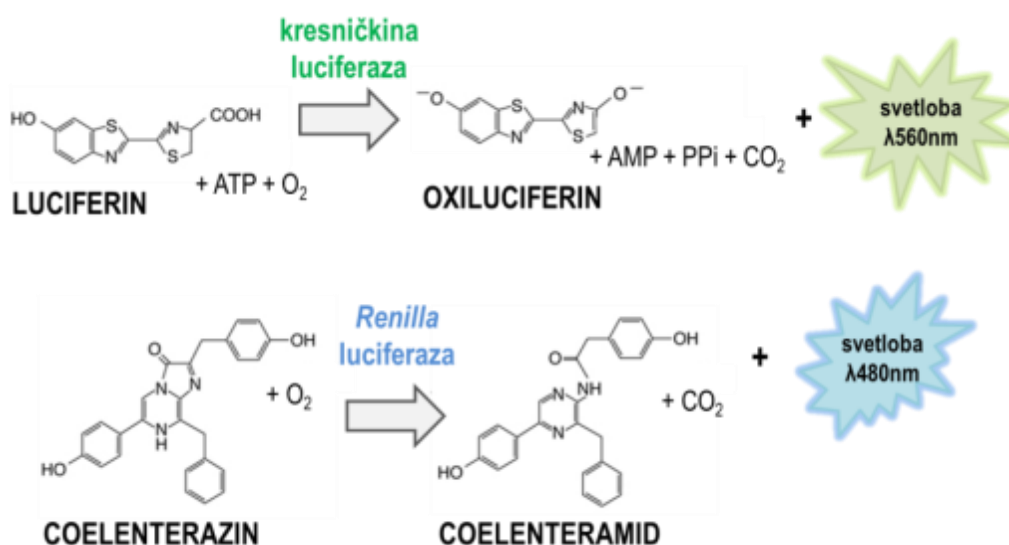
20 minut pred transfekcijo smo v mešanico dodali PEI (transfekcijski reagent), katerega volumen smo izračunali glede na količino DNK. Tipična količina pripravljene raztopine PEI je 6μl/500ng DNK. V laminariju smo odpipetirali pripravljene transfekcijske mešanice v

luknjice nacepljenih plošč po pripravljenem načrtu. Po transfekciji smo plošče vrnili v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂.

3.2.3 Merjenje luciferazne aktivnosti

Luminescenca je oblika oddajanja svetlobe, ki ne nastaja s pomočjo toplote. Tega so sposobni tudi nekateri živi organizmi (npr. kresničke, nekateri nižji morski organizmi, bakterije ...) prek encimskih reakcij (bioluminescenca).

Encim luciferaza je pogosto uporabljen poročevalski protein za analizo učinkovitosti transkripcije. Njegove glavne prednosti so visoka občutljivost, hitrost, enostavna detekcija in relativno nizka cena. Z luminometrom lahko zaznamo intenziteto svetlobe, nastale pri biokemijski reakciji pretvorbe substrata.



Slika 21: Biokemijski reakciji, ki ju katalizirata kresničkina luciferaza (zgoraj) in *Renilla* luciferaza (spodaj)

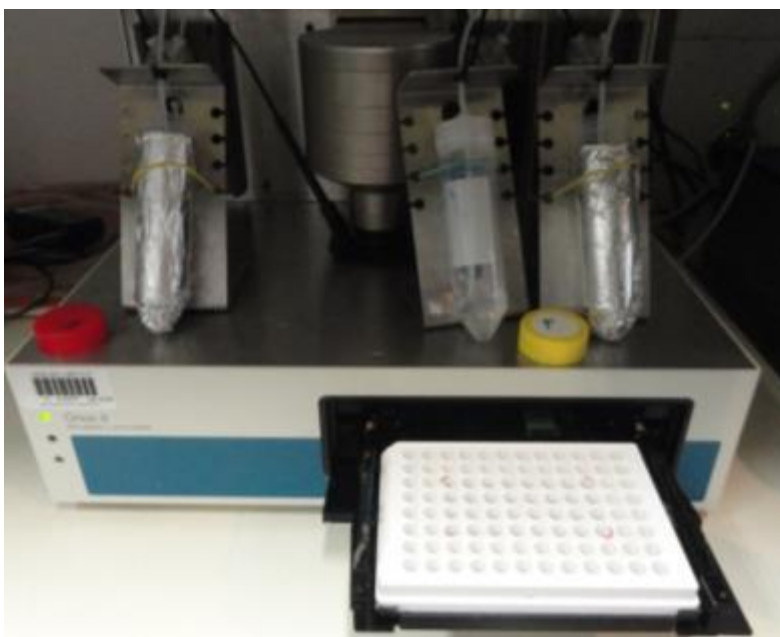
Pri obeh reakcijah prek oksidacije substratov luciferina oziroma coelenterazina nastaneta različna produkta in svetloba. Reakcija kresničkine luciferaze povzroča oddajanje svetlobe valovne dolžine 560 nm, reakcija *Renilla* luciferaze pa 480 nm. Zaradi različnih substratov in različnih valovnih dolžin nastale svetlobe lahko njuni aktivnosti merimo v istem sistemu.

Sestavine pufrov za merjenje aktivnosti kresničkine in *Renilla* luciferaze so navedene v Preglednici 3. Komponente pufrov hranimo na -20 °C ali -80 °C in jih pred začetkom dela odtajamo na sobni temperaturi.

Merili smo aktivnost dveh različnih luciferaz – kresničkine (reporter) in *Renilla* luciferaze (kontrola transfekcije), zato smo pripravili 2 različna pufra. Aktivnost obeh luciferaz lahko merimo hkrati, ker uporabljata različna substrata. Ta smo dodali pred začetkom merjenja, luciferin za kresničkino in coelenterazin za *Renilla* luciferazo. Centrifugirke s substratoma smo zavili v alufolijo, saj sta oba svetlobno občutljiva.

Iz transfeciranih gojitvenih plošč s 96 luknjicami smo z vakuumsko črpalko previdno odsesali medij iz luknjic. Komercialen lizni pufer, pripravljen v petkratni koncentraciji, smo razredčili v sterilni MQ vodi do enkratne končne koncentracije. Nato smo odpipetirali 30 μ l v posamezno luknjico in ploščo inkubirali na sobni temperaturi za 10 minut.

Luciferazno aktivnost smo merili z luminometrom, ki smo ga upravljali z računalniškim programom Simplicity 4.2. Pred začetkom dela smo injektorje sprali z etanolom, MQ + 0.1 % DMSO in MQ. Nato smo centrifugirke s pufri namestili na injektorje. Najprej vedno izmerimo aktivnost kresničkine luciferaze, šele zatem aktivnost *Renilla* luciferaze, saj pH *Renilla* pufra deaktivira kresničkino luciferazo.



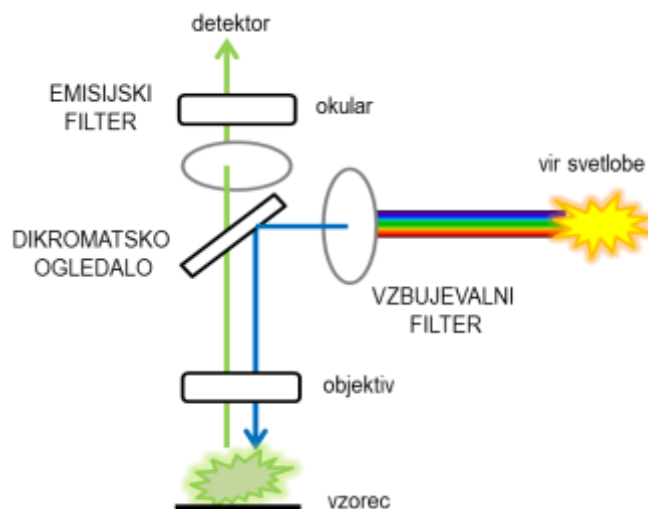
Slika 22: Merjenje luciferazne aktivnosti z luminometrom Orion (foto: Ana Milovanović)

Luminometer poda izmerjene vrednosti luciferazne aktivnosti v obliki absolutnih števil in jih izvozi v programu Microsoft Office Excel. Kot podatek za prikaz uporabimo relativne luciferazne enote (RLE) – tj. vrednosti kresničkine luciferaze (poročevalski protein), normalizirane na vrednosti *Renilla* luciferaze (kontrola učinkovitosti transfekcije) v istem vzorcu. RLE izračunamo tako, da vrednosti kresničkine luciferaze delimo z vrednostmi *Renilla* luciferaze. Eksperimente z luciferaznim poročevalcem smo izvedli v 4 paralelkah, za prikaz končnih rezultatov smo upoštevali povprečje 3–4 paralelek. V primeru velikih odstopanj smo eno od vrednosti izločili. Na grafih smo prikazali tudi standardne odklone upoštevanih vrednosti.

3.2.4 Fluorescentna mikroskopija

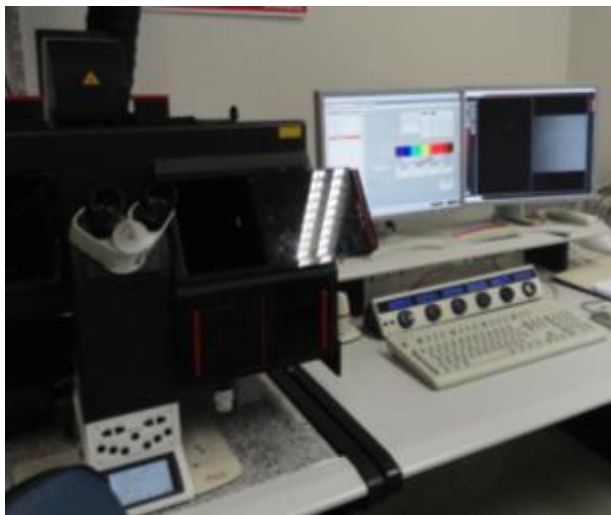
Fluorescenca je vrsta luminiscence, ki nastane pri absorpciji fotonov kratkovalovne svetlobe (vzbujevalna svetloba). Zaradi tega snov skoči v višje energijsko stanje, iz katerega se v osnovno energijsko stanje vrne šele ob oddaji fotonov z daljšo valovno dolžino (emisijaska

svetloba). To opazimo kot vidno svetlobo, pri čemer je energija sevanih fotonov nižja od absorbiranih.



Slika 23: Shema fluorescentnega mikroskopa

Fluorescenco v bioloških vzorcih spremljamo s fluorescentno mikroskopijo. Vzorec osvetlimo s svetlobo določene valovne dolžine, ki jo absorbirajo fluorofori in oddajo svetlobo daljše valovne dolžine. Vzbujevalno svetlobo od emisijske ločimo z uporabo vzbujevalnih in emisijskih filtrov. Fluorescentni mikroskop vsebuje tudi dikromatsko ogledalo, ki vzbujevalno svetlobo usmeri proti vzorcu. Pri takšni mikroskopiji lahko spremljamo vzorec v realnem času brez lize celic, kar omogoča večkratno analizo istega vzorca in spremljanje kinetike dogajanja.



Slika 24: Fluorescentni konfokalni mikroskop v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (foto: Ana Halužan Vasle)

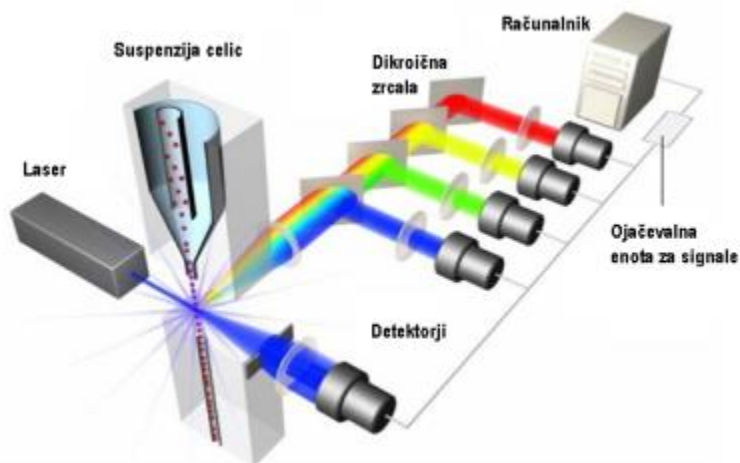
Mikroskopične komore s predhodno transfeciranimi celicami smo položili na mizico mikroskopa, osvetlili vzorec in prilagodili fokus. Mikroskop smo upravljali z računalniškim programom Leica LasAF. Fluorescentni protein mCitrine smo vzbujevali s 514-nm lasersko linijo 100-mW argonskega laserja pri 25 % laserske moči ter oddano svetlobo detektirali med 520 in 560 nm. Fluorescentni protein mCherry (kontrola transfekcije) smo vzbujevali z 1-mW 543-nm HeNe laserjem ter oddano svetlobo detektirali med 590 in 630 nm. Moč laserjev smo prilagodili glede na svetilnost fluorescentnih proteinov v vzorcu. Vse nastavitve na mikroskopu pri določeni

povečavi (z izjemo fokusa) so ostale enake od prvega do vključno zadnjega dne, kar je omogočilo primerjanje vzorcev med seboj. V vsakem vzorcu smo posneli vsaj 5 slik, po koncu snemanja pa smo mikroskopsko komoro vrnili v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂.

Slike smo kvantificirali z računalniškim programom LasAF, ki poda povprečne vrednosti intenzitete posameznih slikovnih pik (pikslov) na posneti sliki. Vrednosti intenzitete fluorescence mCitrine (poročevalski protein) smo normalizirali na vrednosti fluorescence mCherry (kontrola transfekcije). Tako smo dobili relativne fluorescenčne enote (RFE), ki smo jih predstavili na grafih. Za posamezne vzorce smo upoštevali povprečja in standardne odklone 5 posnetih slik. Zatem smo slike obdelali s programom za obdelavo mikroskopskih slik ImageJ, pri čemer smo enake spremembe upoštevali pri vseh primerjanih slikah.

3.2.5 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda, ki omogoča merjenje in analiziranje fizikalne in kemijske lastnosti celic. Z usmerjenim žarkom svetlobe laserja določene valovne dolžine zaznavamo posamezne celice v suspenziji celic. Te prehajajo skozi tanek tunel ena za drugo. Pri prehodu posamezne celice skozi laserski žarek se ta odbije pod različnimi koti. To zaznavajo detektorji, med katerimi je eden postavljen nasproti laserja, drugi pa ležijo pravokotno na laserski žarek. Detektor nasproti laserja meri neposredno sipanje svetlobe¹¹, eden od stranskih pa meri stransko sipanje¹². Celice s fluorofori ob prehodu preko laserja oddajajo svetlobo valovne dolžine, ki jo zaznajo posebni detektorji.



Slika 25: Shema pretočnega citometra

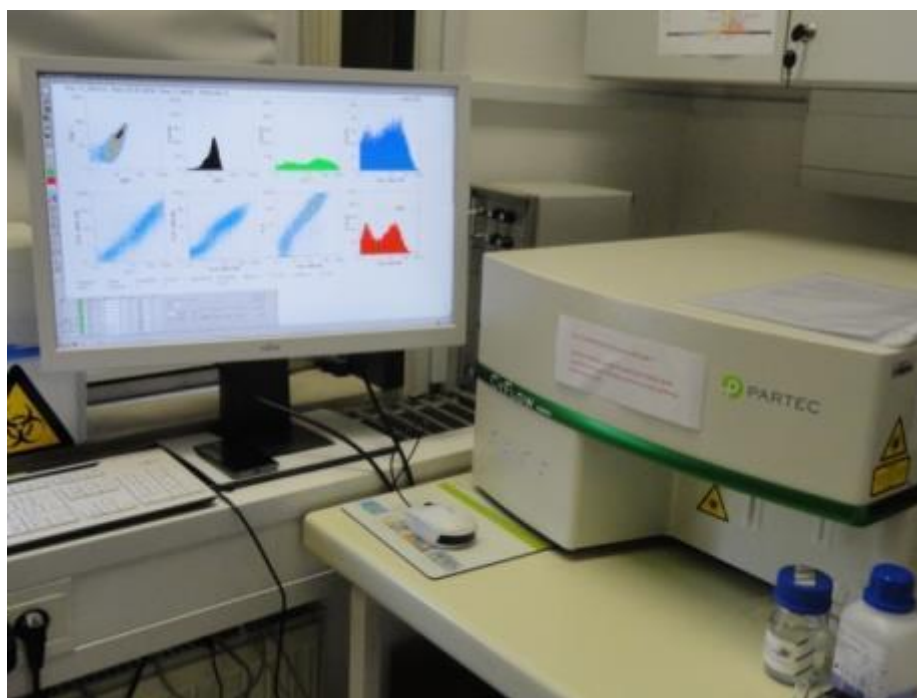
Vir svetlobe so navadno laserji, ki jih na drugi strani toka suspenzije celic zaznavajo mnogi detektorji oziroma fotopomnoževalke. Svetloba do in od vzorca potuje preko filtrov in dikroičnih zrcal, ki svetlobo lomijo. Pred

¹¹ ang. »forward scatter« – FSC

¹² ang. »side scatter« – SSC

računalniškimi sistemom za analizo signalov leži še ojačevalna enota (povzeto po: <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>).

Prehodno transfecirane celice v gojitvenih ploščah z 12 luknjicami smo prenesli na led, jim odstranili gojišče ter jih s curkom pipete odlepili s podlage in resuspenirali v 500 μ l ohlajenega PBS pufra. Suspenzijo celic smo prenesli v plastične kivete in vanje dodali še približno 2ml PBS pufra. Vsako posebej smo nataknili na vzorčno točko pretočnega citometra, ki smo ga upravljali z računalniškim programom FloMax. Fluorescentni protein mCitrine smo detektirali s 488-nm diodnim laserjem, fluorescentni protein TagBFP s 405 nm diodnim laserjem in fluorescentni protein iRFP (kontrola transfekcije) s 633 nm diodnim laserjem. V vsakem vzorcu smo analizirali vsaj 30000 iRFP pozitivnih celic.



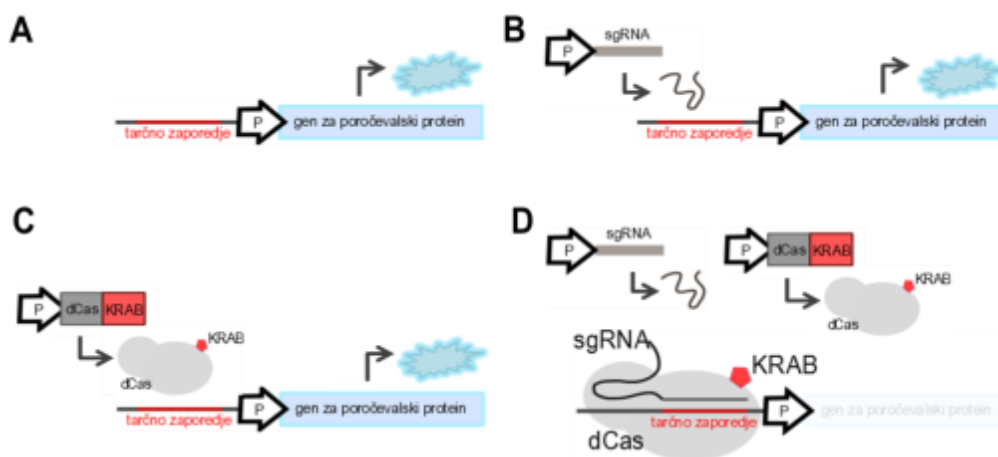
Slika 26: Pretočni citometer v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (foto: Ana Milovanović)

Po končanem delu smo podatke obdelali z računalniškim programom FlowJo. V vzorcu netransfeciranih celic smo glede na stransko in neposredno sipanje svetlobe določili populacijo živih celic in enako populacijo izbrali pri vseh ostalih vzorcih. Za nadaljnjo analizo smo v teh populacijah uporabili le iRFP pozitivne celice (kontrola učinkovitosti transfekcije).

4 Rezultati

4.1 Delovanje CRISPR/Cas sistema

Za načrtovanje genskih omrežij je pomembna natančna in učinkovita regulacija, zato smo v začetku želeli preveriti, ali sistem CRISPR/Cas deluje po pričakovanjih (mehanizem delovanja je podrobneje opisan v poglavju 2.4.1). V teoriji morata biti za specifično in učinkovito vezavo na tarčno DNK zaporedje prisotna tako protein dCas9 kot ustrezna sgRNA.



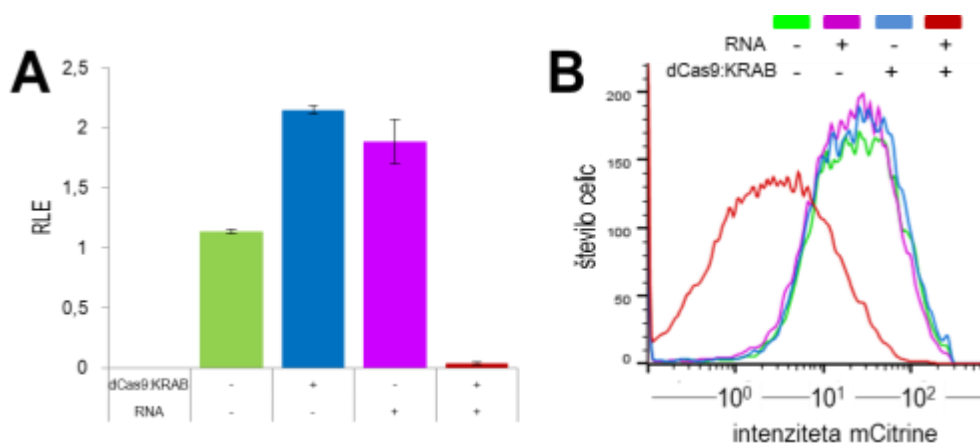
Slika 27: Shema delovanja CRISPR Cas sistema

A) V primeru hkratne odsotnosti proteina dCas9:KRAB in sgRNA pride do izražanja poročevalskega gena.

B) in C) Če je prisoten le eden od para (samo sgRNA oziroma samo dCas9:KRAB) ne pride do transkripcijske inhibicije in se poročevalski protein izraža.

D) V primeru prisotnosti obeh (dCas9:KRAB in sgRNA) pride do specifične vezave na tarčno zaporedje in inhibicije transkripcije (shema pripravila: Tina Lebar).

Delovanje sistema smo preverili z dvema metodama – s pretočno citometrijo, kjer smo kot poročevalski protein uporabili rumeni fluorescentni protein mCitrine, in z merjenjem luciferazne aktivnosti (metodi sta podrobneje opisani v poglavjih 3.2.3 in 3.2.5). Meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 14).



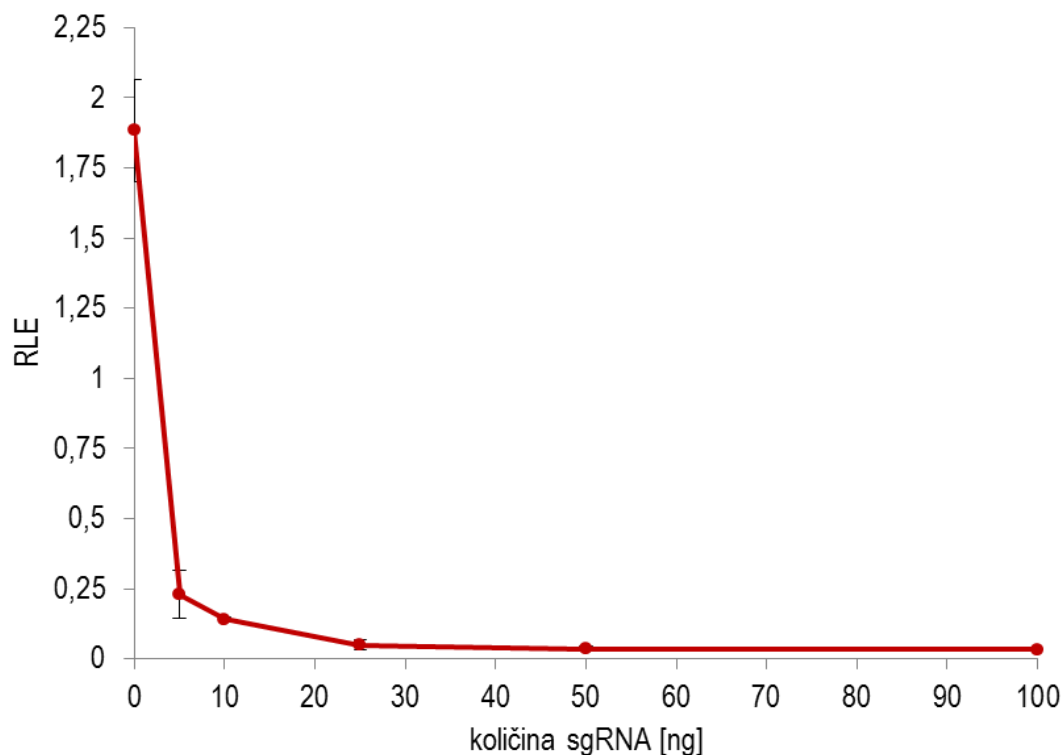
Graf 1: Preverjanje delovanja CRISPR/Cas sistema

A) Preverjanje delovanja sistema CRISPR/Cas z merjenjem luciferazne aktivnosti. Podatki so predstavljeni v relativnih luciferaznih enotah (RLE). Upoštevali smo povprečje in standardne odklone treh paralelnih eksperimentov. Iz grafa je razvidno, da do inhibicije transkripcije poročevalskega gena pride le v primeru prisotnosti tako dCas9:KRAB kot sgRNK.

B) Preverjanje delovanja sistema CRISPR/Cas s pretočno citometrijo. Na abscisni osi je podana intenziteta poročevalskega proteina mCitrine, na ordinatni pa število celic, ki svetijo s takšno intenziteto. Iz grafa je razvidno, da do zmanjšanja intenzitete fluorescence pride le v prisotnosti tako dCas9:KRAB kot sgRNK.

4.2 Učinkovitost CRISPR/Cas sistema

Ko smo potrdili, da sistem CRISPR/Cas deluje po pričakovanjih, smo poskusili optimizirati količine sgRNK, potrebne za učinkovito transkripcijsko inhibicijo. Za poročevalski protein smo ponovno uporabili kresničkino luciferazo. Poleg 50 ng luciferaze smo v celice transfecirali prebitek plazmida z zapisom za dCas9:KRAB in različne količine plazmida z zapisom za ustrezno sgRNK. Meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 15).

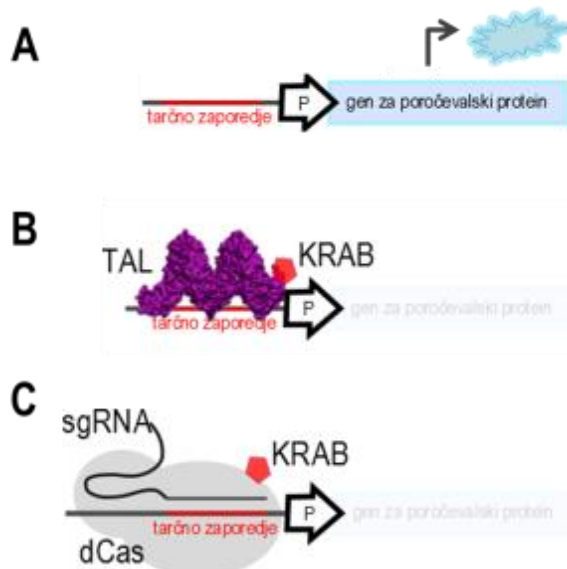


Graf 2: Odvisnost izražanja poročevalskega proteina od količine sgRNA

Količina poročevalskega plazmida je 50ng. Podatki so predstavljeni v relativnih luciferaznih enotah (RLE). Upoštevali smo povprečje in standardne odklone treh paralelk eksperimenta. Iz grafa lahko razberemo, da je za učinkovito transkripcijsko inhibicijo dovolj že zelo majhna količina sgRNA, relativno na količino poročevalskega plazmida. Do zasičenja pride pri razmerju 1:2.

4.3 Primerjava učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev

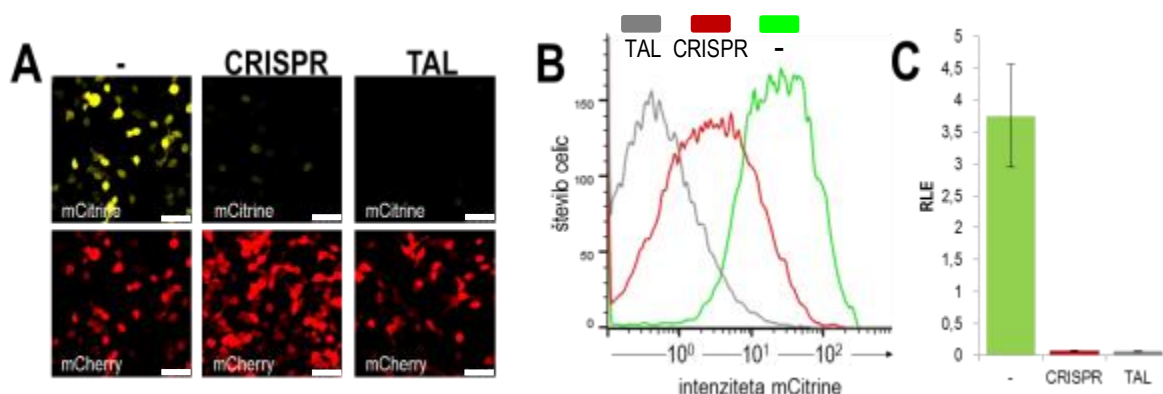
Za začetno oceno primernosti sistema CRISPR/Cas pri sestavljanju umetnih genskih omrežij smo njegovo učinkovitost primerjali z učinkovitostjo TAL efektorjev, ki so bili v ta namen že uporabljeni. S fluorescentno mikroskopijo, pretočno citometrijo in merjenjem luciferazne aktivnosti (metode so natančneje opisane v poglavjih 3.2.4, 3.2.5 in 3.2.3) smo preverili učinkovitost transkripcijske inhibicije poročevalskega gena v prisotnosti proteina dCas9:KRAB in ustrezne sgRNA oziroma TAL transkripcijskega represorja, ki se veže na isto prepoznavno mesto. Vse meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 15).



Slika 28: Vezava testiranih transkripcijskih faktorjev na tarčno zaporedje

A) Ob odsotnosti transkripcijskega faktorja pride do izražanja poročevalskega proteina.

B) in C) Ob prisotnosti TAL/CRISPR transkripcijskega represorja pride do transkripcijske inhibicije poročevalskega gena (shemo pripravila Tina Lebar).



Slika 29: Primerjava učinkovitosti transkripcijske represije sistema CRISPR/Cas s TAL efektorji

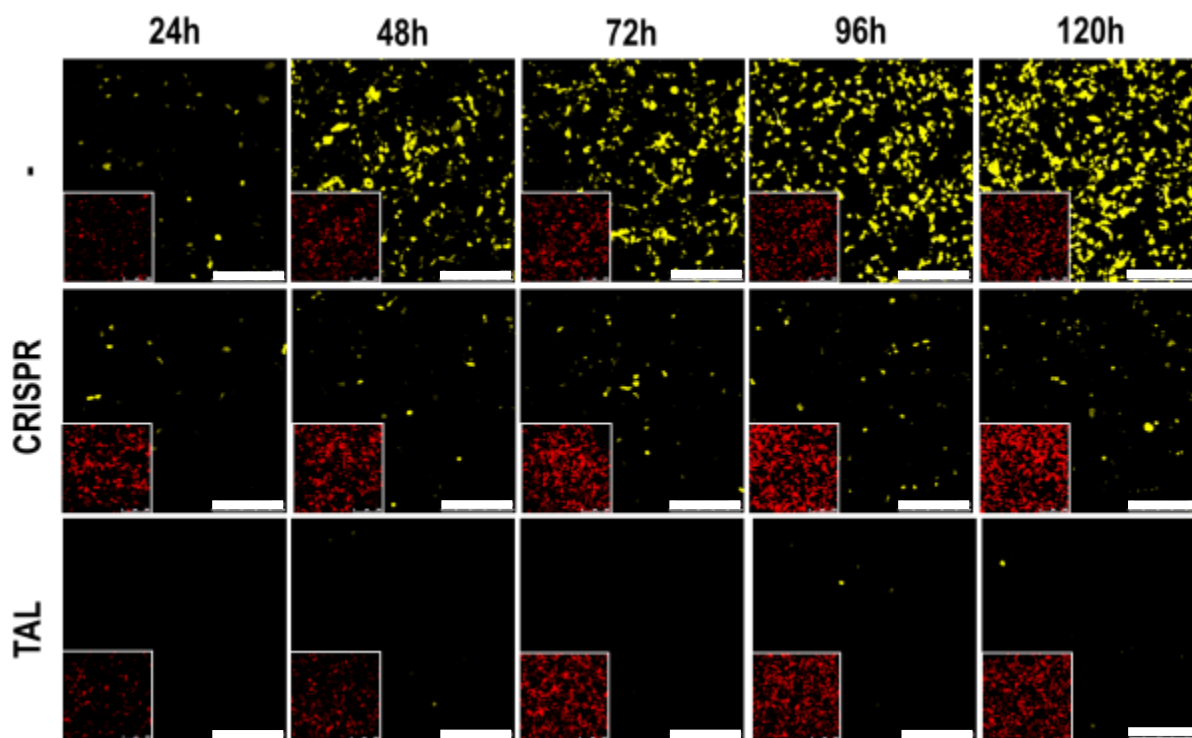
A) Primerjava učinkovitosti s fluorescentno mikroskopijo. Zgornja vrsta slik predstavlja fluorescentni protein mCitrine (poročevalec), spodnja pa fluorescentni protein mCherry (kontrola učinkovitosti transfekcije). Bela črta v spodnjem desnem kotu slik predstavlja 50 μm . Iz slik je razvidno, da transkripcijski represorji tako na osnovi TAL efektorjev kot sistema CRISPR/Cas inhibirajo transkripcijo poročevalskega gena, pri čemer se zdi inhibicija s TAL efektorji rahlo učinkovitejša (foto: avtorici naloge).

B) Primerjava učinkovitosti s pretočno citometrijo. Na abscisni osi je podana intenziteta poročevalskega proteina mCitrine, na ordinatni osi pa število celic, ki svetijo s takšno intenziteto. Iz grafa lahko razberemo inhibicijo transkripcije poročevalskega gena z obema sistemoma, ki je v primeru TAL efektorjev vidno učinkovitejša.

C) Primerjava učinkovitosti z merjenjem luciferazne aktivnosti. Podatki so predstavljeni v relativnih luciferaznih enotah (RLE). Upoštevali smo povprečja in standardne odklone treh paralelnih eksperimentov. Iz grafa je razvidno, da je učinkovitost obeh sistemov s to metodo zelo primerljiva.

4.4 Kinetika represije s TAL in CRISPR/Cas sistemom

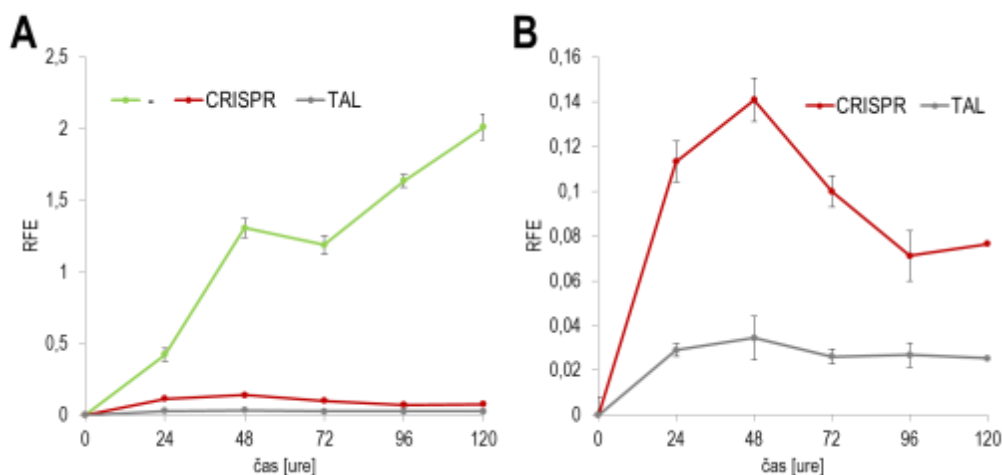
Zanimalo nas je tudi, kako se izražanje poročevalskega proteina ob dodatku transkripcijskega represorja spreminja s časom. To smo preverili s fluorescentno mikroskopijo. Vzorce smo spremljali 5 dni po prehodni transfekciji, vsakih 24 ur. (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 15).



Slika 30: Časovno spremljanje transkripcijske inhibicije s transkripcijskimi represorji na osnovi TAL efektorjev in CRISPR/Cas sistema

Slike prikazujejo izražanje poročevalskega proteina mCitrine v odsotnosti oziroma prisotnosti transkripcijskega represorja. V spodnjem levem kotu je prikazano izražanje fluorescentnega proteina mCherry (kontrola učinkovitosti transfekcije). Bela črta v spodnjem desnem kotu predstavlja 250 μ m. Iz slik je razvidno, da v odsotnosti transkripcijskega represorja intenziteta poročevalskega proteina mCitrine s časom narašča, v prisotnosti obeh transkripcijskih represorjev pa je intenziteta nižja in se s časom na videz ne spreminja. V primeru transkripcijskih represorjev na osnovi TAL efektorjev (spodnja vrstica) je intenziteta najnižja.

Za boljšo oceno kinetike smo slike pred obdelavo kvantificirali v računalniškem programu LasAF (postopek kvantifikacije je podrobneje opisan v poglavju 2.4.2.1).



Graf 3: Izražanje poročevalskega proteina v odvisnosti od časa

A) Podatki so predstavljeni v relativnih fluorescenčnih enotah (RFE). Upoštevali smo povprečja in standardne odklone petih posnetih slik v istem vzorcu ob istem času. Iz grafa je razvidno, da fluorescenca poročevalskega proteina v kontrolnem vzorcu brez transkripcijskega represorja s časom narašča, ob prisotnosti transkripcijskega represorja pa fluorescenca v začetku rahlo naraste, kasneje pa pade.

B) Podatki iz slike A, predstavljeni brez kontrolnega vzorca. Fluorescenca ob prisotnosti transkripcijskega represorja na osnovi TAL efektorja v začetku naraste manj in se kasneje tudi hitreje ustali v primerjavi s prisotnostjo CRISPR/Cas transkripcijskega represorja.

4.5 Učinkovitost transkripcijske inhibicije z vezavo na različna DNK-vezavna zaporedja

Da bi preverili, ali imajo različne molekule sgRNA podobne biokemijske lastnosti (podobno učinkovitost vezave), smo testirali tri različne sgRNA, ki se vežejo na enaka zaporedja kot trije od predhodno testiranih TAL efektorjev⁹. Zaporedjem za vezavo TAL efektorjev je dodano še mesto PAM ter 3–4 naključni nukleotidi, saj je učinkovitost vezave sgRNA boljša pri vezavnem mestu, daljšem od 20 nukleotidov⁽²⁹⁾. Nukleotidna zaporedja vezavnih mest so navedena v Preglednici 11.

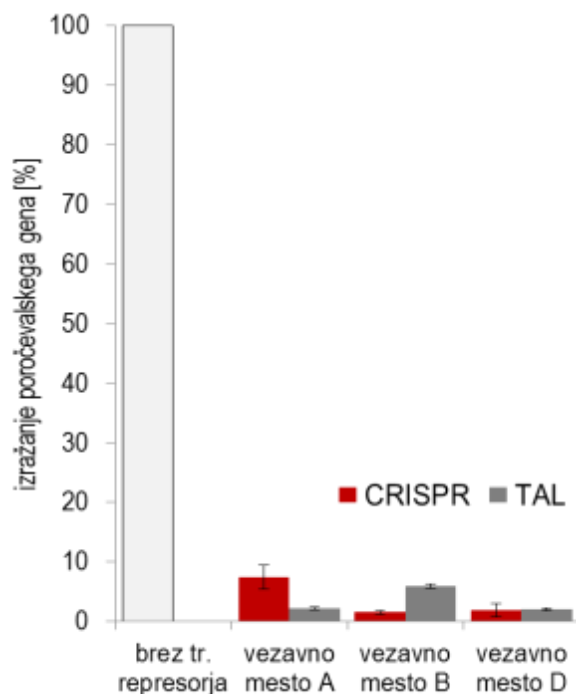
Preglednica 11: Oznake in nukleotidna zaporedja testiranih molekul sgRNA in TAL efektorjev

Na podčrtana zaporedja se vežejo testirani TAL efektorji, s sivo barvo so označeni nukleotidi, dodani za vezavo sgRNA, z vijolično pa mesto PAM.

Oznaka vezavnega mesta	Nukleotidno zaporedje
A	<u>tTTACTGCTGCTCCCGCT</u> ACTcgg
B	<u>tCTTCCGTTTCCACATCT</u> TCAcgg
D	<u>tCGTCCAATAGCTTCTC</u> AGTTcgg

Za izvedbo vseh prejšnjih eksperimentov smo uporabljali sgRNA in TAL transkripcijski represor, načrtovana za vezavo na vezavno mesto D. Učinkovitost različnih sgRNA smo preverili z merjenjem luciferazne aktivnosti, za primerjavo pa smo vzporedno testirali tudi tri predhodno uporabljene TAL efektorje, za katere je bila učinkovita vezava že dokazana. Vse meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov. Rezultate smo

normalizirali na izražanje poročevalskega gena v odsotnosti transkripcijskega represorja – predvideli smo, da je izražanje poročevalskega gena takrat maksimalno (100 %). Iz povprečij relativnih luciferaznih enot (RLE) smo izračunali odstotek izražanja v prisotnosti transkripcijskega faktorja (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 16).

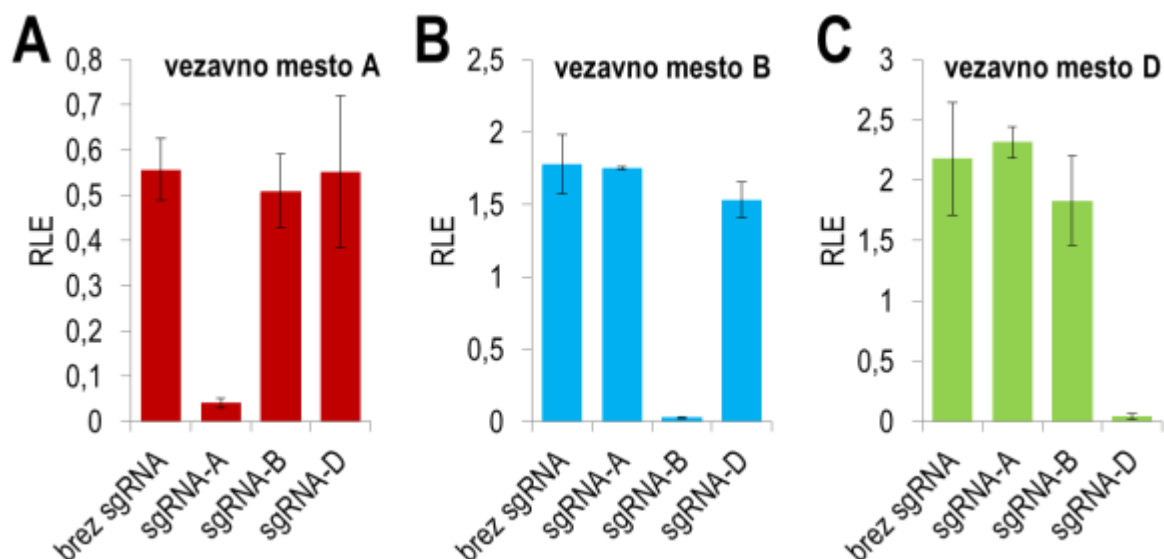


Graf 4: Učinkovitost transkripcijske inhibicije poročevalskega gena kresničkine luciferaze ob vezavi transkripcijskih represorjev na osnovi CRISPR/Cas sistema oziroma TAL efektorjev na različna vezavna zaporedja

Podatki so predstavljeni v odstotkih izražanja poročevalskega gena v prisotnosti transkripcijskega faktorja. Upoštevali smo povprečja in standardne odklone treh paralelnih eksperimentov. Iz grafa je razvidna učinkovita vezava vseh transkripcijskih represorjev na vsa tri vezavna mesta z rahlimi odstopanji pri vezavi CRISPR/Cas na mesto A oziroma TAL efektorja na mesto B.

4.6 Specifičnost vezave na predvideno DNK-vezavno zaporedje

Pri izgradnji genskih regulatornih omrežij potrebujemo veliko število regulatornih elementov v isti celici. Ko smo pokazali, da se vse tri testirane sgRNK učinkovito vežejo na svoja vezavna mesta, nas je zanimalo, ali jih lahko uporabimo v istem sistemu – torej ali se na svoja vezavna zaporedja vežejo specifično. Z merjenjem luciferazne aktivnosti smo za vse tri sgRNK preverili, če se izbrana sgRNK veže tudi na katero od vezavnih mest za drugi dve. Meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 16).



Graf 5: Specifičnost transkripcijske inhibicije poročevalskega gena z vezavo treh različnih sgRNK na različna DNK-vezavna mesta

Podatki so predstavljeni v relativnih luciferaznih enotah (RLE). Upoštevali smo povprečja in standardne odklone treh paralelk eksperimenta:

A) Inhibicija transkripcije poročevalskega gena ob prisotnosti različnih sgRNK in vezavnega mesta A.

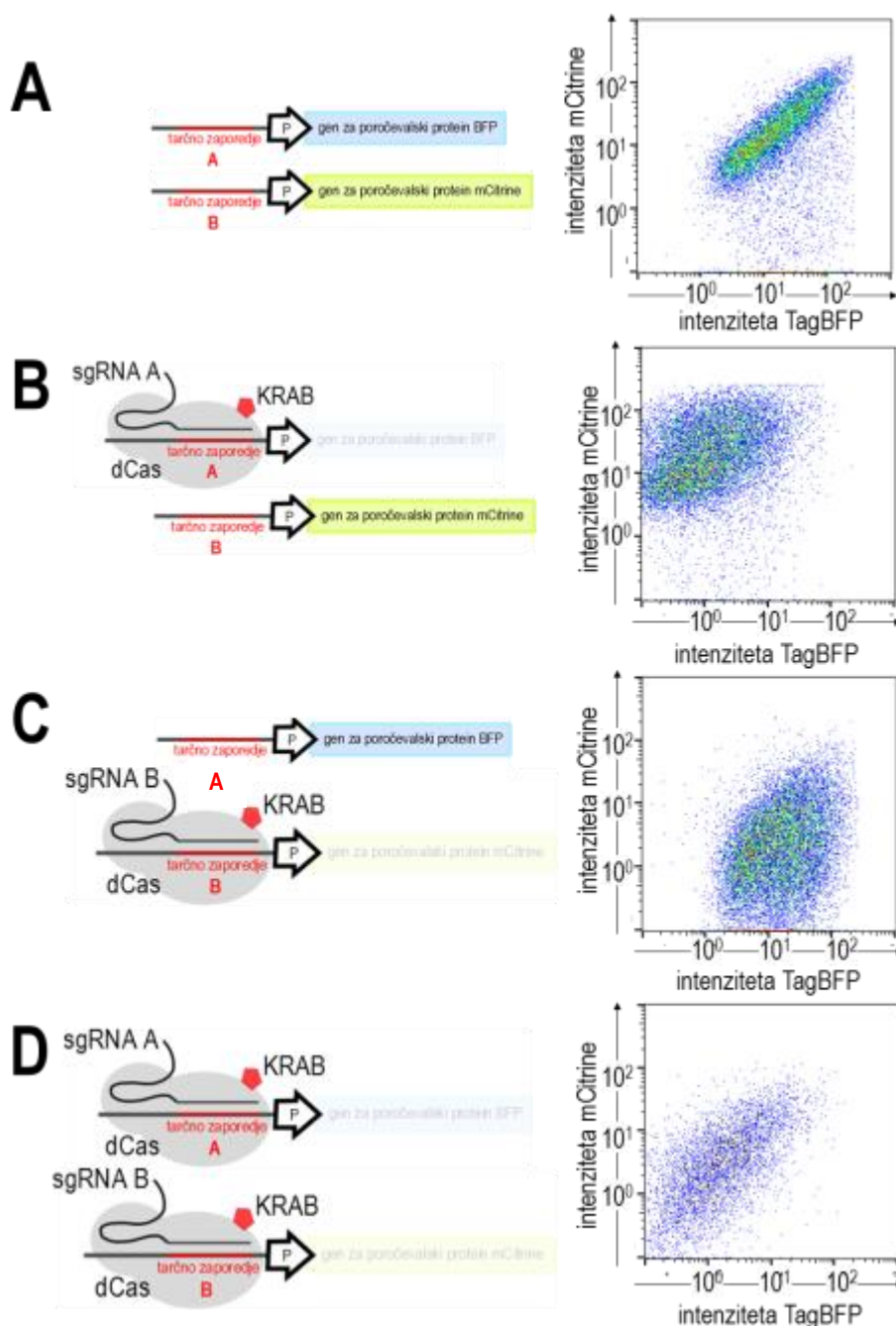
B) Inhibicija transkripcije poročevalskega gena ob prisotnosti različnih sgRNK in vezavnega mesta B.

C) Inhibicija transkripcije poročevalskega gena ob prisotnosti različnih sgRNK in vezavnega mesta D.

Iz vseh treh grafov je razvidno, da do transkripcijske inhibicije pride le ob prisotnosti sgRNK za vezavo na izbrana vezavna mesta.

4.7 Delovanje dveh RNK v isti celici

S testiranjem specifičnosti vezave (poglavje 3.6) smo spremljali transkripcijsko inhibicijo z vsako od treh sgRNK posebej, v ločenih populacijah celic. Sklenili smo preizkusiti še delovanje dveh sgRNK v isti celici, s čimer bi lahko zagotovo potrdili, da več različnih sgRNK specifično deluje v istem sistemu in da med seboj ne interagirajo. Za to smo potrebovali dva različna poročevalska proteina, ki ju lahko spremljamo z isto metodo. Izbrali smo fluorescentna proteina mCitrine (rumeni fluorescentni protein) in TagBFP (modri fluorescentni protein), njihovo izražanje pa spremljali s pretočno citometrijo. Meritve smo izvedli 3 dni po prehodni transfekciji ustreznih plazmidov (količine transfeciranih plazmidov so navedene v Preglednici 17).



Slika 31: Spremljanje transkripcijske inhibicije dveh poročevalskih proteinov z dvema različnima sgRNK v isti celici

Na levi strani slike so predstavljene sheme posameznega poskusa, na desni pa rezultati pretočne citometrije. Na abscisnih oseh so podane intenzitete poročevalskega proteina mCitrine, na ordinatnih pa intenzitete poročevalskega proteina TagBFP. Vsaka točka na grafu predstavlja eno celico.

A) Izražanje poročevalskih proteinov v odsotnosti sgRNK. Iz grafa lahko po pričakovanjih razberemo visoko intenziteto obeh poročevalskih proteinov.

B) Izražanje poročevalskih proteinov v prisotnosti sgRNK-A. Kompleks proteina dCas:KRAB in sgRNK-A se specifično veže na svoje prepoznavno zaporedje pred genom za protein TagBFP ter tako inhibira njegovo transkripcijo. To je razvidno iz nižje intenzitete fluorescence TagBFP, intenziteta fluorescence mCitrine pa ostaja visoka.

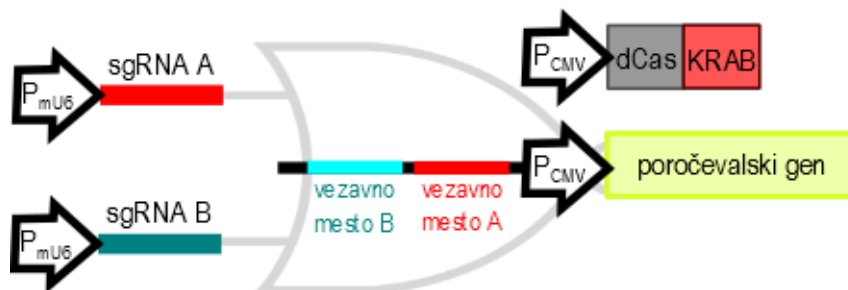
C) Izražanje poročevalskih proteinov v prisotnosti sgRNK-B. Kompleks proteina dCas:KRAB in sgRNK-B se specifično veže na svoje prepoznavno zaporedje pred genom za protein mCitrine in tako inhibira njegovo transkripcijo. To je razvidno iz nižje intenzitete fluorescence mCitrine, intenziteta fluorescence TagBFP pa ostaja visoka.

D) Izražanje poročevalskih proteinov ob hkratni prisotnosti sgRNK-A in sgRNK-B. Kompleksa proteina dCas:KRAB in sgRNK-A oziroma sgRNK-B se specifično vežeta na svoji prepoznavni zaporedji pred ustreznim genom za poročevalski protein in inhibirata njuno transkripcijo. To je razvidno iz nizke intenzitete fluorescence obeh poročevalskih proteinov.

4.8 Načrtovanje genskih omrežij na osnovi CRISPR/Cas sistema

Poleg eksperimentalnega dela smo se v sklopu raziskovalne naloge pogovorili, kako bi lahko s preizkušenimi elementi načrtovali enostavnejša genska omrežja (podrobneje opisana v poglavju 2.1.1). Mednje spadajo statična logična vrata, poznamo pa še kompleksnejša, dinamična genska omrežja, kamor uvrščamo na primer preklopna stikala in oscilatorje.

Sodelavci laboratorija, v katerem se je izvajala raziskovalna naloga, so nedavno pripravili vseh 16 dvovhodnih logičnih vrat z uporabo transkripcijskih represorjev na osnovi TAL efektorjev. NOR vrata so univerzalna logična vrata, saj lahko z njihovim zaporednim povezovanjem pripravimo katero koli dvovhodno logično funkcijo. NOR vrata na osnovi CRISPR/Cas sistema smo načrtovali po enakem principu, kot je bilo to storjeno s TAL efektorji. Poleg osnovnih NOR vrat smo z njihovim povezovanjem poskusili načrtovati tudi AND vrata.



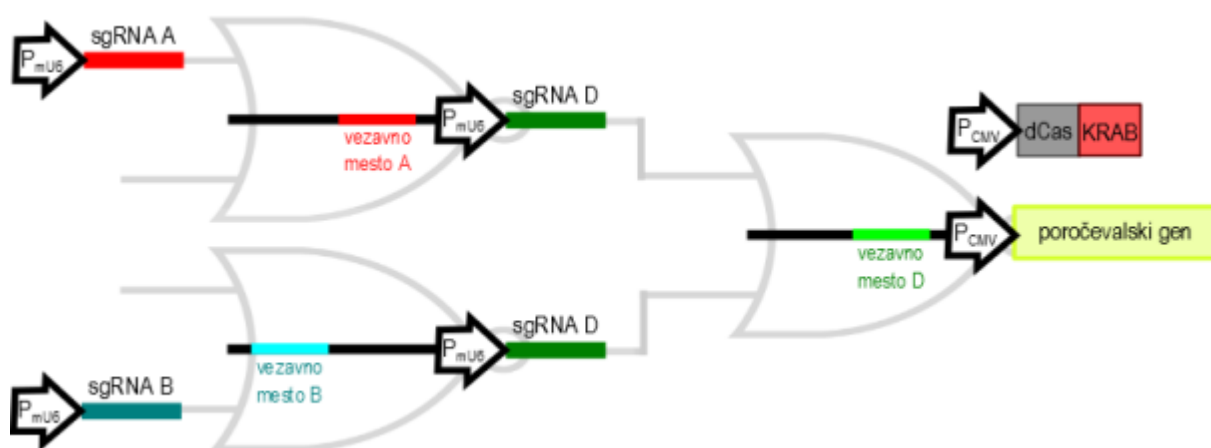
Slika 32: Shema NOR vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema

Za pripravo NOR vrat na osnovi CRISPR/Cas transkripcijskih represorjev bi potrebovali 2 različni sgRNK (vhodna signala), protein dCas9:KRAB ter plazmid s poročevalskim genom (izhod) z DNK-vezavnima mestoma za obe sgRNK (shemo pripravila: Tina Lebar).

Preglednica 12: Predvideno delovanje NOR logičnih vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema

Poročevalski gen (izhod) se izraža le, ko ni prisoten noben od vhodnih signalov (sgRNK-A ali sgRNK-B).

vhod		izhod	Shema
A	B		
0	0	1	
0	1	0	
1	0	0	
1	1	0	

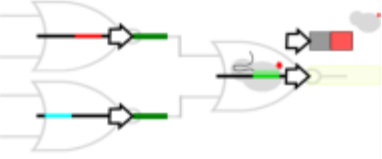
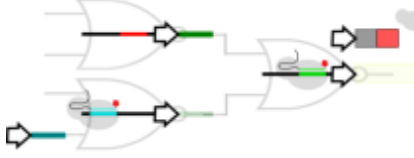
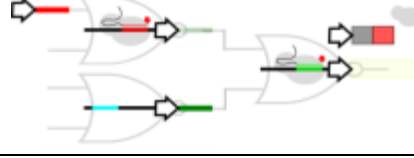
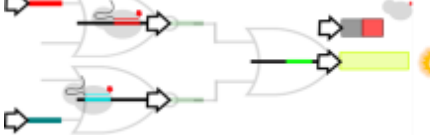


Slika 33: Shema AND vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema

Za pripravo AND vrat na osnovi CRISPR/Cas transkripcijskih represorjev bi bilo potrebno med seboj povezati tri NOR vrata. Vhodna signala predstavljata sgRNK-A in sgRNK-B, vsaka od teh nadzoruje izražanje tretje sgRNK (D). Slednja nadzoruje izražanje poročevalskega proteina (izhod). sgRNK-D se ne izraža samo v primeru prisotnosti obeh vhodnih sgRNK, zato je prepis poročevalskega gena mogoč (shemo pripravila: Tina Lebar).

Preglednica 13: Predvideno delovanje AND logičnih vrat na osnovi CRISPR/Cas sistema

Poročevalski gen (izhod) se izraža le ob prisotnosti obeh vhodnih signalov (sgRNK-A in sgRNK-B).

vhod		izhod	Shema
A	B		
0	0	0	
0	1	0	
1	0	0	
1	1	1	

5 Razprava in sklepi

5.1 Razprava

Kompleksnejša genska omrežja zahtevajo veliko število učinkovitih, dobro okarakteriziranih in specifičnih transkripcijskih faktorjev, ki ne vplivajo na osnovne celične procese. Modularne DNK vezavne proteine, npr. cinkove prste ali TAL efektorje, lahko načrtujemo za vezavo na katero koli tarčno zaporedje in pripravimo različne DNK vezavne proteine v skoraj neomejenem številu. Tako se izognemo možnosti vezave na genomsko DNK gostiteljskih celic, poleg tega pa imajo tudi zelo podobne biokemijske lastnosti, kar omogoča lažje načrtovanje in razumevanje kompleksnih genskih omrežij.

Pred kratkim so že bila pripravljena umetna genska omrežja z uporabo transkripcijskih faktorjev na osnovi TAL efektorjev⁹. Žal pa so TAL efektorji veliki modularni proteini, zaradi česar je priprava genov za nove transkripcijske faktorje draga in počasna, veliko število velikih proteinov pa predstavlja tudi metabolno obremenitev za celico. Drugo možnost načrtovanja umetnih transkripcijskih faktorjev predstavlja sistem CRISPR/Cas, katerega prednost je hitra in cenejša sinteza elementov za vezavo na različna tarčna zaporedja, saj so molekule RNK kratke. Poleg tega sinteza majhnih RNK molekul predstavlja za celico manjšo metabolno obremenitev.

V okviru raziskovalne naloge smo želeli preveriti, ali je CRISPR/Cas sistem primeren za sestavljanje umetnih genskih omrežij v sesalski celični liniji HEK293T. Učinkovitost in specifičnost transkripcijske inhibicije s transkripcijskimi represorji na osnovi CRISPR/Cas sistema smo primerjali s TAL efektorji. Za dodatno potrditev primernosti sistema smo preizkusili delovanje dveh različnih sgRNK molekul v isti celici.

5.1.1 Delovanje CRISPR/Cas sistema

Najprej je bilo potrebno dokazati delovanje CRISPR/Cas sistema. Zanimalo nas je, če se na tarčno DNK zaporedje specifično veže le kompleks sgRNK in proteina dCas9 (Slika 27). V sesalsko celično linijo HEK293T smo transfecirali plazmid z zapisom za protein dCas9, spojen z domeno KRAB za transkripcijsko inhibicijo, ter plazmid z zapisom za sgRNK. Dodali smo še plazmid z genom za poročevalski protein, ki je pred promotorskim zaporedjem vseboval 7 ponovitev tarčnih DNK vezavnih mest za uporabljeno sgRNK. Pričakovali smo, da bo do inhibicije transkripcije poročevalskega gena prišlo le v primeru prisotnosti vseh treh plazmidov (Slika 27). Iz Grafa 1a je razvidno, da rezultati ustrezajo pričakovanjem – do transkripcijske inhibicije poročevalskega gena kresničkine luciferaze pride le ob opisani situaciji, ne pa tudi ob prisotnosti samo proteina dCas9 brez sgRNK oziroma sgRNK brez dCas9.

Za zanesljivejšo potrditev rezultatov smo poskus ponovili in pri tem izražanja poročevalskega gena spremljali z drugo metodo, pretočno citometrijo (Graf 1b). Tudi tu so bili rezultati pričakovani – iz slike je jasno razvidno, da se intenziteta fluorescence poročevalskega

proteina mCitrine zmanjša le v opisanem primeru. Rezultati obeh metod potrjujejo Hipotezo 1 (Poglavje 1.2.1), sistem deluje kot inhibitor, za pravilno delovanje CRISPR/Cas sistema pa potrebujemo protein dCas:KRAB in sgRNK.

5.1.2 Učinkovitost CRISPR/Cas sistema in optimizacija količin sgRNK

V nadaljevanju smo preizkusili, kakšna količina plazmida z zapisom za sgRNK povzroči maksimalno transkripcijsko inhibicijo. Pri kompleksnih genskih omrežjih bi bilo potrebno v isto celico transfecirati plazmide z zapisi za več različnih sgRNK, vendar je količina transfecirane DNK omejena zaradi citotoksičnosti večjih količin transfekcijskega reagenta. Za sestavljanje genskih omrežij z večjim številom elementov je zato pomembno, da do učinkovite transkripcijske inhibicije pride pri čim manjših količinah transfeciranih plazmidov. V sesalske celice smo poleg fiksni količini poročevalskega plazmida z genom za kresničkino luciferazo in plazmida z zapisom za protein dCas9, spojen z domeno KRAB, transfecirali različne količine sgRNK. Opazili smo, da do učinkovite transkripcijske inhibicije pride že pri relativno majhnih količinah plazmida z zapisom za sgRNK, do maksimalne inhibicije pa pride pri razmerju sgRNK:dCas9:KRAB 1:2 (Graf 2).

Natančnejšo optimizacijo količin bi lahko dosegli s preizkušanjem več vmesnih količin sgRNK plazmida. Pri poskusu smo uporabili prebitek plazmida z zapisom za protein dCas9:KRAB, zato bi bilo potrebno testirati tudi različne količine tega plazmida pri fiksni količini sgRNK. Preizkusili bi lahko tudi poročevalske plazmide z večjim številom vezavnih mest, saj bi bila transkripcijska inhibicija pri večji količini vezanih represorskih proteinov verjetno še učinkovitejša.

5.1.3 Primerjava učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev

Transkripcijski represorji na osnovi TAL efektorjev so bili za pripravo umetnih genskih omrežij že uporabljeni⁹. Za začetno oceno primernosti sistema CRISPR/Cas za enak namen smo sklenili učinkovitost transkripcijske inhibicije primerjati z že uporabljenimi elementi. V sesalske celice smo poleg poročevalskega plazmida transfecirali:

- i. plazmida z zapisi za sgRNK ter za protein dCas9, spojen z domeno KRAB in
- ii. plazmid z zapisom za TAL efektor, spojen z domeno KRAB, ki se veže na enako tarčno DNK vezavno mesto kot uporabljena sgRNK (Slika 28).

V začetku smo učinkovitost transkripcijske inhibicije preverjali s fluorescentno mikroskopijo, kjer se je izkazalo, da TAL efektorji učinkoviteje inhibirajo transkripcijo poročevalskega gena (Slika 29a). Rezultate smo sklenili potrditi še z drugimi metodami – uporabili smo pretočno citometrijo (Slika 29b) in merjenje luciferazne aktivnosti (Slika 29c). Tako poskus s pretočno citometrijo kot poskus s fluorescentno mikroskopijo sta pokazala, da je prišlo do večjega zmanjšanja intenzitete fluorescence v primeru TAL efektorjev. Primerjava učinkovitosti z

merjenjem luciferazne aktivnosti je v nasprotju z drugima metodama pokazala, da sta sistema podobno učinkovita.

Pri prvih dveh metodah smo kot poročevalec uporabili fluorescentni protein z dolgo razpolovno dobo⁴⁰, zato smo sklepali, da so rezultati različni zaradi krajše razpolovne dobe kresničkine luciferaze. Vseeno smo sklepali, da sistem CRISPR/Cas deluje približno enako učinkovito kot TAL efektorji, vendar zgoraj opisani rezultati nakazujejo na počasnejšo vezavo CRISPR/Cas kompleksa. S fluorescentno mikroskopijo smo spremljali izražanje poročevalskega fluorescentnega proteina v intervalih 24 ur, pet dni zapored (Slika 30). Mikroskopske slike smo kvantificirali s programom LasAF (postopek je natančneje opisan v poglavju 3.4.2.1) in tako dobili kvantitativne podatke za zanesljivejšo primerjavo (Graf 3a in 3b). Rezultati mikroskopije nazorno pokažejo, da sistem CRISPR potrebuje več časa za dobro inhibicijo. TAL efektorji že po 24 urah odlično zavrejo izražanje poročevalskega proteina, medtem ko je v začetku transkripcijska inhibicija s CRISPR/Cas sistemom rahlo slabša. Po štirih dneh je razlika v izražanju poročevalskega proteina manjša. S tem smo potrdili predpostavko o počasnejši vezavi CRISPR/Cas kompleksa v primerjavi z vezavo TAL efektorjev. Takšni rezultati so smiselni, glede na to, da se mora na tarčno DNK v primeru TAL efektorjev vezati le protein, pri CRISPR/Cas sistemu pa dodaten korak predstavlja sestavljanje Cas9-RNK kompleksa, ki se šele nato lahko specifično veže na svoje prepoznavno zaporedje. Za dodatno potrditev rezultatov bi lahko uporabili tudi poročevalske proteine s krajšo razpolovno dobo, ki bi omogočili spremljanje transkripcijske inhibicije v realnem času.

5.1.4 Učinkovitost vezave različnih sgRNK molekul na tarčna DNK zaporedja

Za sestavljanje kompleksnejših genskih omrežij potrebujemo večje število učinkovitih elementov. Preverili smo učinkovitost vezave treh različnih sgRNK molekul na različna tarčna DNK zaporedja v primerjavi s TAL efektorji za vezavo na ista prepoznavna zaporedja (Preglednica 11, Graf 4). Kot poročevalski protein smo tokrat uporabili kresničkino luciferazo. Pri vezavnem mestu A so TAL efektorji malo bolje zavirali delovanje poročevalskega gena kot sistem CRISPR/Cas, pri vezavnem mestu B pa so bili rezultati obratni. Do dobre inhibicije je pri obeh vrstah transkripcijskih efektorjev prišlo pri vezavnem mestu D. Razlike v izražanju so zelo majhne, inhibicija je v vseh primerih okrog 95 odstotna. Odstopanja v rezultatih so lahko posledica napak pri pipetiranju ali računanju ali pa pri različnem številu celic v posameznih luknjicah gojitvene plošče.

Glede na majhne razlike in možnosti napak ne moremo zagotovo trditi, da so učinkovitosti posameznih sgRNK oziroma TAL efektorjev različne. Poskus bi bilo za potrditev razlik potrebno večkrat ponoviti, lahko pa sklepamo, da je učinkovitost vezave in transkripcijske inhibicije vseh treh testiranih sgRNK molekul zadostna za uporabo v kompleksnejših sistemih, s čimer potrjujemo Hipotezo 2 (Poglavje 1.2.1).

5.1.5 Specifičnost vezave različnih sgRNK na svoja prepoznavna zaporedja

Poleg učinkovitosti morajo elementi, uporabljeni v kompleksnih genskih omrežjih, delovati tudi specifično – v primeru transkripcijskih faktorjev to pomeni, da se morajo vezati na svoja prepoznavna zaporedja in vplivati le na transkripcijo tarčnega gena. Preizkusili smo specifičnost vezave treh testiranih sgRNK molekul. Kot poročevalski protein smo uporabili kresničkino luciferazo. Poročevalske plazmide z različnimi tarčnimi zaporedji smo transfecirali v sesalske celice, skupaj s plazmidom z zapisom za protein dCas9:KRAB in s plazmidi za tri različne sgRNK. Rezultati so pokazali, da do transkripcijske inhibicije pride le ob prisotnosti ustrezne sgRNK. Če je prisotna sgRNK za vezavo na drugačno vezavno mesto, je izražanje poročevalskega gena podobno kot v odsotnosti sgRNK (Graf 5). Rahla odstopanja v izražanju so najverjetneje posledica napak pri pipetiranju ali računanju.

Dodatno bi lahko preverili še specifičnost vezave pri zelo podobnih vezavnih mestih. To bi lahko storili s primerjavo zelo podobnih sgRNK in določili število nukleotidov, ki predstavljajo razliko za sistem. To bi omogočilo oceniti količino napak, ki jih sistem lahko naredi pri zaznavi tarčnih zaporedij.

5.1.6 Delovanje različnih sgRNK molekul v isti celici

Z zgoraj opisanimi poskusi smo dokazali učinkovitost in specifičnost transkripcijske inhibicije s CRISPR/Cas sistemom. Da bi se dodatno prepričali o uporabnosti sistema za sestavljanje kompleksnejših genskih omrežij, smo morali preveriti, če testirani elementi lahko v istem sistemu delujejo neodvisno drug od drugega. Zanimalo nas je, ali dve različni sgRNK molekuli lahko učinkovito in specifično delujeta v isti celici ter se pri tem medsebojno ne ovirata. V sesalske celice smo transfecirali plazmid z zapisom za protein dCas9:KRAB in plazmida z zapisi za dve različni molekuli sgRNK. Dodali smo tudi poročevalska plazmida, enega z vezavnim mestom za sgRNK-A pred genom za moder fluorescentni protein BFP in drugega z vezavnim mestom za sgRNK-B pred genom za rumeni fluorescentni protein mCitrine (Slika 31). Izražanje BFP in mCitrine smo spremljali s pretočno citometrijo. V odsotnosti obeh sgRNK sta se močno izražala oba poročevalska proteina (Slika 31a), ob dodatku zgolj sgRNK-A ali sgRNK-B pa je po pričakovanjih prišlo do transkripcijske inhibicije tarčnega poročevalskega proteina, kar je vidno kot zmanjšanje intenzitete ustreznega poročevalskega proteina, istočasno pa ostaja intenziteta fluorescence drugega poročevalca močna (Slika 31b in Slika 31c). V primeru dodatka obeh sgRNK hkrati se je zmanjšala intenziteta fluorescence obeh poročevalskih proteinov (Slika 31d).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da več različnih sgRNK lahko v isti celici deluje učinkovito, specifično in medsebojno neodvisno. Ti rezultati potrjujejo Hipotezo 3 (Poglavje 1.2.1), torej ustreznost CRISPR/Cas sistema za uporabo v kompleksnejših genskih omrežjih.

5.1.7 Načrtovanje logičnih operacij s CRISPR/Cas sistemom

V okviru raziskovalne naloge smo se pogovorili o načrtovanju bioloških NOR logičnih vrat s pomočjo sistema CRISPR/Cas. Takšna vrata so univerzalna, saj nam njihovo povezovanje omogoči sestavljanje katerih koli dvovhodnih logičnih vrat⁹. NOR vrata na osnovi CRISPR/Cas bi lahko sestavili po istem principu, kot je to že bilo storjeno z uporabo TAL efektorjev⁹. Za to bi potrebovali le dve različni sgRNK, protein dCas:KRAB ter poročevalski gen z vezavnimi mesti za obe sgRNK pred promotorjem (Slika 32). Molekuli sgRNK predstavljata vhodna signala, izražanje poročevalskega gena pa predstavlja izhod. Na ta način bi se poročevalski gen izražal zgolj ob odsotnosti obeh vhodnih signalov (molekul sgRNK), kar ustreza pravilnostni tabeli NOR logičnih vrat (Preglednica 12).

S povezovanjem več NOR vrat bi lahko sestavili kompleksnejša vrata, kot so na primer AND logična vrata, ki jih lahko pripravimo s tremi NOR logičnimi vrati (Slika 33). Vhodna signala ponovno predstavljata dve različni molekuli sgRNK, vsaka od njiju pa nadzoruje izražanje tretje molekule sgRNK na ločenih plazmidih. Tretja sgRNK nadzoruje izražanje poročevalskega proteina, izraženega le v njeni odsotnosti in prisotnosti obeh vhodnih sgRNK molekul (Preglednica 13).

5.1.8 Omejitve sistema in možnosti izboljšave

Sistem CRISPR/Cas ima navkljub številnim prednostim tudi nekaj slabosti.

Prva je v izražanju molekul sgRNK, ki se izražajo pod drugačnimi promotorji kot mRNK, iz katerih nastanejo proteini. Majhne RNK se navadno izražajo z RNK polimerazo III, medtem ko izražanje mRNK zahteva RNK polimerazo II. Molekule sgRNK se s takšnim promotorjem sicer izražajo dobro, problem pa nastane, če želimo izražanje tega promotorja nadzorovati z drugo sgRNK. Ne vemo namreč, kako domena KRAB vpliva na regulacijo tega promotorja, večja težava bi se pojavila pri kompleksnejših omrežjih, kjer bi poleg transkripcijskih represorjev uporabljali tudi transkripcijske aktivatorje – za aktivacijsko domeno VP16 je namreč znano, da na te promotorje ne deluje⁴¹. Rešitev bi bila uporaba drugačnih efektorskih domen ali pa izražanje sgRNK iz promotorjev, ki za transkripcijo uporabljajo RNK polimerazo II. Nekatere raziskovalne skupine so že pokazale, da je izražanje majhnih RNK molekul iz takšnega promotorja mogoče, vendar je slabše kot v primeru promotorjev, ki uporabljajo RNK polimerazo III⁴².

Dinamični sistemi potrebujejo hitro delujoče in učinkovite transkripcijske faktorje. Glavna slabost sistema CRISPR/Cas je počasna vezava, ki bi v kompleksnejših in dinamičnih sistemih močno upočasnila doseganje ustreznega končnega izhoda. Za kompleksnejše sisteme bi zato potrebovali molekule sgRNK, ki nadzorujejo izražanje drugih molekul sgRNK, vsak dodaten korak pa dodatno upočasni regulacijo tarčnega gena. Že v primeru grajenja logičnih vrat s TAL efektorji, ki se glede na naše rezultate na DNK vežejo hitreje kot CRISPR/Cas kompleks, je bilo za dosežek ustreznega izhoda potrebno 5 dni⁹. V primeru uporabe sistema

CRISPR/Cas bi se izražanje poročevalskega gena (izhoda) pri več zaporedno povezanih logičnih vratih ustalilo še kasneje.

5.1.9 Možnosti praktične uporabe umetnih genskih omrežij

Umetna genska omrežja in umetni transkripcijski faktorji predstavljajo nove rešitve v medicini, diagnostiki in metabolnem inženiringu.

Eno od možnosti uporabe gensko spremenjenih celic s kompleksnimi logičnimi omrežji predstavlja celična terapija za različne bolezni, med drugim na primer raka. Rakave celice na svoji površini izražajo nekatere proteine, ki jih zdrave celice ne izražajo. Terapevtske celice bi lahko prepoznale dva antigena na površini rakavih celic in s funkcijo AND sprožile prepisovanje proteina, ki bi povzročil apoptozo rakavih celic. Tako bi uničili zgolj celice, ki imajo prisotna oba antigena in zagotovili preživetje zdravim celicam, ki izražajo samo enega ali nobenega od izbranih antigenov⁴³.

Terapevtskih celic v telo pacienta ne moremo neposredno vstaviti, saj bi jih telo prepoznalo kot tujke, ki bi jih imunski sistem bolnika uničil. Lahko pa bi celice zaprli v kapsulo iz materiala, ki imunskega odziva ne sproži, na primer iz alginata⁴⁴. Do sedaj so s pomočjo takšnih kapsul že vstavljali celice, ki so sproščale snovi za zaviranje rasti tumorjev v mišjih modelih⁴⁵.

Takšne gensko spremenjene celice bi prav tako lahko uporabljali v diagnostiki, kjer bi kot izhodni signal uporabili na primer spremembo barve. V tem primeru bi ob dodatku vzorca (krvi ali tkiva) celice spremenile barvo v odvisnosti od vstavljenega genskega omrežja.

Druga možnost uporabe je vnašanje transkripcijskih faktorjev za preprečitev oziroma vsaj omejevanje genetsko pogojenih bolezni. Transkripcijske faktorje bi načrtovali za vezavo pred tarčni gen, uvesti pa bi jih morali tarčno v celice tkiva, saj delujejo zgolj znotraj celice, v kateri se nahajajo. Vnos zapisov za transkripcijske faktorje v obliki plazmidov bi lahko v celice izvedli s pomočjo elektroporacije. V primeru pojava bolezni zaradi neaktivnega gena bi transkripcijo spodbudili s transkripcijskimi faktorji z aktivacijskimi efektorskimi domenami.

Mnogo ljudi trpi za slabim imunskim sistemom (CVID¹³), ki je lahko pogojen s slabo aktivnostjo super-lokusa na kromosomu 6 (regija HLA), odgovornega za dober imunski sistem⁴⁶. Z aktivacijskimi domenami bi lahko spodbudili proizvodnjo B celic pri ljudeh, ki jih imajo premalo, in te celice nadalje spodbudili za izdelavo večje količine imunoglobulinov – predvsem IgG in IgA.

¹³ ang. »Common Variable Immune Deficiency«

Možnost uporabe genskih omrežij se kaže tudi pri zaznavanju onesnaženosti okolja z biosenzorji. Ob zaznavi prevelikih količin dveh različnih snovi bi nas celice lahko na to opozorile s spremembo barve ipd. Takšno zaznavanje stanja okolja bi najbolje delovalo s pomočjo rastlin. Nekaj raziskovalnih skupin je dokazalo, da je sistem CRISPR/Cas primeren za nadzorovanje genov v rastlinah⁴⁷. Možnost priprave bioloških orodij za zaznavanje stanja v okolju predstavljajo tudi kvasovke in bakterije.

Načrtovani transkripcijski faktorji bi lahko pripomogli tudi v metabolnem inženiringu. Aktivirali in pospešili bi lahko proizvodnjo proteinov za biosintezo določenih snovi v celicah. V primeru bioloških zdravil bi to pomenilo hitrejšo proizvodnjo, posledično hitrejšo sintezo, manj stroškov in cenejši končni izdelek.

5.1.10 Etični vidik uporabe gensko spremenjenih organizmov

Genska omrežja imajo velik potencial za uporabo v medicini, metabolnem inženiringu in diagnostiki, vendar z uporabnostjo in dostopnostjo prinašajo možnosti za zlorabo. Pojavljajo se tudi etično-moralna vprašanja o vstavljanju gensko spremenjenih celic v človeški organizem.

Biosenzorje bi lahko uporabljali za detekcijo onesnaženosti okolja, vendar velja prepoved izpuščanja gensko spremenjenih organizmov v okolje. Takšni organizmi bi kljub temu v nekontroliranem okolju težko preživel.

Zakonsko so gensko spremenjeni organizmi prepovedani. V primeru dovoljene uporabe GSO bi bila vprašljiva pripravljenost pacientov za zdravljenje s celično terapijo. To je zanimalo tudi slovensko ekipo na tekmovanju iGEM 2012, ki je izvedla anketo o uporabi gensko spremenjenih organizmov. Rezultati so pokazali, da bi bilo kar 71 % pacientov pripravljeno sprejeti celično terapijo (<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/SocietyMedia>). Javnost je omenjenim terapijam manj naklonjena, saj je bilo kar 41 % anketirancev proti uporabi takšne terapije. Rezultati ankete tako kažejo, da bi bila večina pacientov, v primeru dovoljenja vstavljanja GSO v telo, pripravljena sprejeti ali pa vsaj razmisliti o uporabi takšnih terapij. Med javnostjo je mnenje bolj deljeno, kar osvetli potrebo po širjenju znanja in jasnejši definiciji gensko spremenjenih organizmov za širšo javnost.

Čez nekaj desetletij, ob dobri raziskanosti delovanja, obnašanja in interakcij takšnih celic z okoljem, bo njihova uporaba v terapevtske, okoljske in industrijske namene verjetno manj sporna. Realnejša je hitrejša uporaba gensko spremenjenih celic v diagnostiki, saj bi takšna aplikacija potekala v kontroliranem laboratorijskem okolju.

6 Sklepi

Rezultati naših eksperimentov potrjujejo, da sistem CRISPR/Cas deluje po pričakovanjih in je primerljiv s TAL efektorji, ki so bili za gradnjo kompleksnih genskih omrežij že uporabljeni. Sistem je učinkovit, deluje specifično, ob prisotnosti več molekul sgRNK v eni celici pa te delujejo neodvisno druga od druge. To nakazuje, da je sistem CRISPR/Cas potencialno uporaben za načrtovanje umetnih genskih omrežij. Z rezultati smo potrdili vse tri hipoteze, zastavljene pred začetkom dela (Poglavje 1.2.1).

V okviru raziskovalne naloge smo teoretično zasnovali NOR in AND vrata na osnovi CRISPR/Cas sistema. Po razpravi smo prišli do sklepa, da bi bila takšna umetna genska omrežja uporabna predvsem v medicinskih in okoljskih aplikacijah v obliki biosenzorjev. Spoznali smo tudi etično podlago uporabe gensko spremenjenih celic.

7 Viri in literatura

7.1 Viri besedila

1. Davidson, E. & Levin, M. Gene regulatory networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4935 (2005).
2. Khalil, A. S. & Collins, J. J. Synthetic biology: applications come of age. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 367–79 (2010).
3. Ausländer, S. & Fussenegger, M. From gene switches to mammalian designer cells: present and future prospects. *Trends Biotechnol.* **31**, 155–68 (2013).
4. Cameron, D. E., Bashor, C. J. & Collins, J. J. A brief history of synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 381–90 (2014).
5. Nevozhay, D., Zal, T. & Balázs, G. Transferring a synthetic gene circuit from yeast to mammalian cells. *Nat. Commun.* **4**, 1451 (2013).
6. Tamsir, A., Tabor, J. J. & Voigt, C. A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical “wires”. *Nature* **469**, 212–5 (2011).
7. Moon, T. S., Lou, C., Tamsir, A., Stanton, B. C. & Voigt, C. A. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. *Nature* **491**, 249–53 (2012).
8. Kramer, B. P., Fischer, C. & Fussenegger, M. BioLogic gates enable logical transcription control in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* **87**, 478–484 (2004).
9. Gaber, R. *et al.* Designable DNA-binding domains enable construction of logic circuits in mammalian cells. *Nat. Chem. Biol.* (2014). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24413461>
10. Siuti, P., Yazbek, J. & Lu, T. K. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 448–52 (2013).
11. Gardner, T. S., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339–342 (2000).
12. Kramer, B. P. *et al.* An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**, 867–70 (2004).
13. Elowitz, M. B. & Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403**, 335–338 (2000).
14. Stricker, J. *et al.* A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* **456**, 516–9 (2008).
15. Danino, T., Mondragón-Palomino, O., Tsimring, L. & Hasty, J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature* **463**, 326–30 (2010).
16. Tigges, M., Dénervaud, N., Greber, D., Stelling, J. & Fussenegger, M. A synthetic low-frequency mammalian oscillator. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2702–11 (2010).
17. Tigges, M., Marquez - Lago, T. T., Stelling, J. & Fussenegger, M. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature* **457**, 309–12 (2009).
18. Frietze, S. & Farnham, P. J. A Handbook of Transcription Factors. **52**, 261–277 (2011).
19. Margolin, J. F. *et al.* Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4509–13 (1994).

20. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563–4 (1988).
21. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5547–51 (1992).
22. Garg, A., Lohmueller, J. J., Silver, P. A. & Armel, T. Z. Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites. *Nucleic Acids Res* **40**, 7584–7595 (2012).
23. Fu, F. *et al.* Zinc Finger Database (ZiFDB): a repository for information on C2H2 zinc fingers and engineered zinc-finger arrays. *Nucleic Acids Res.* **37**, D279–83 (2009).
24. Zhang, L. *et al.* Synthetic zinc finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 33850–60 (2000).
25. Ramirez, C. L. *et al.* Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods* **5**, 374–5 (2008).
26. Mak, A. N.-S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. & Stoddard, B. L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716–9 (2012).
27. Bogdanove, A. J. & Voytas, D. F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**, 1843–6 (2011).
28. Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 143–8 (2011).
29. Sander, J. D. *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat. Biotechnol.* **29**, 697–698 (2011).
30. Zhang, F. *et al.* Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat. Biotechnol.* **29**, 149–53 (2011).
31. Geissler, R. *et al.* Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS One* **6**, e19509 (2011).
32. Cong, L., Zhou, R., Kuo, Y.-C., Cunniff, M. & Zhang, F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat. Commun.* **3**, 968 (2012).
33. Team:Slovenia/TheSwitch - 2012.igem.org. at
<<http://2012.igem.org/Team:Slovenia/TheSwitch>>
34. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 181–90 (2010).
35. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–83 (2013).
36. Mali, P., Esvelt, K. M. & Church, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat. Methods* **10**, 957–63 (2013).
37. Pennisi, E. The CRISPR craze. *Science* **341**, 833–6 (2013).
38. Gilbert, L. a *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* **154**, 442–51 (2013).
39. Mali, P. *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–8 (2013).

40. Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **12**, 1035–1040 (1999).
41. Das, G., Hinkley, C. S. & Herr, W. Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function. *Nature* **374**, 657–60 (1995).
42. Zhou, H., Xia, X. G. & Xu, Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res.* **33**, e62 (2005).
43. Nissim, L. & Bar-Ziv, R. H. A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells. *Mol Syst Biol* **6**, 444 (2010).
44. Orive, G., Tam, S. K., Pedraz, J. L. & Hallé, J.-P. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* **27**, 3691–700 (2006).
45. Joki, T. *et al.* Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotechnol.* **19**, 35–9 (2001).
46. Park, M. A., Li, J. T., Hagan, J. B., Maddox, D. E. & Abraham, R. S. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* **372**, 489–502 (2008).
47. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. & Nekrasov, V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**, 39 (2013).

7.2 Viri slik

- Slika 2, 6:
povzeti po: Ausländer, S. & Fussenegger, M. From gene switches to mammalian designer cells: present and future prospects. *Trends Biotechnol.* **31**, 155–68 (2013).
- Slika 4:
povzeta po: http://taleffectors.genome-engineering.org/wp-content/uploads/2011/02/tale_rvd1.png (7. 7. 2014) in Mak, A. N.-S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. & Stoddard, B. L. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716–9 (2012).
- Slika 5:
povzeta po: Moon, T. S., Lou, C., Tamsir, A., Stanton, B. C. & Voigt, C. A. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. *Nature* **491**, 249–53 (2012).
- Slika 7:
povzeta po: http://2012.igem.org/wiki/images/6/67/Svn12_thwswitch_switch7%281%29.png (7. 7. 2014).
- Slika 8, 9:
povzeti po: Pennisi, E. The CRISPR craze. *Science* **341**, 833–6 (2013).
- Slika 10:
povzeto po: <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pcdna3.gif>.
- Slika 17:

Halužan Vasle, A., Milovanović, A. Načrtovanje umetnih genskih omrežij (2014).

vir: <http://www.celprogen.com/image/cache/data/imgs/T75%20Flask-500x500.jpg> (5. 7. 2014).

– Slika 25:

povzeto po: <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html> (6. 7. 2014).

8 Priloge

8.1 Priloga A: Količine plazmidov, transfeciranih v posameznih eksperimentih

Preglednica 14: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja delovanja CRISPR/Cas sistema z merjenjem luciferazne aktivnosti (luc) in pretočno citometrijo (cit)

Pri merjenju luciferazne aktivnosti smo kot poročevalski protein uporabili kresničkino luciferazo, kot kontrolo transfekcije pa *Renilla* luciferazo. Pri pretočni citometriji smo kot poročevalski protein uporabili fluorescentni protein mCitrine, kot kontrolo transfekcije pa fluorescentni protein iRFP.

Transfekcijska mešanica								
Plazmidi	RNK		-		+		-	
	dCas9:KRAB		-		-		+	
	luc.	cit.	luc.	cit.	luc.	cit.	luc.	cit.
[d]-CMV-poročevalec	50	400	50	400	50	400	50	400
mU6-sgRNA-D	-	-	50	400	-	-	50	400
CMV-dCas9:KRAB	-	-	-	-	50	400	50	400
pcDNA3	150	1200	100	800	100	800	50	400
kontrola transfekcije	10	100	10	100	10	100	10	100

Preglednica 15: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih primerjave učinkovitosti CRISPR/Cas sistema z učinkovitostjo TAL efektorjev, spremljanja kinetike transkripcijske inhibicije s fluorescentno mikroskopijo (mik.), pretočno citometrijo (cit.) ter merjenjem luciferazne aktivnosti (luc.)

Pri merjenju luciferazne aktivnosti smo kot poročevalski protein uporabili kresničkino luciferazo, kot kontrolo transfekcije pa *Renilla* luciferazo. Pri pretočni citometriji smo kot poročevalski protein uporabili fluorescentni protein mCitrine, kot kontrolo transfekcije pa fluorescentni protein iRFP. Pri fluorescentni mikroskopiji smo kot poročevalski protein uporabili fluorescentni protein mCitrine, kot kontrolo transfekcije pa fluorescentni protein mCherry.

Transfekcijska mešanica									
	-			CRISPR			TAL		
Plazmidi	luc.	mik.	cit.	luc.	mik.	cit.	luc.	mik.	cit.
[d]-CMV-poročevalec	50	100	400	50	100	400	50	100	400
mU6-sgRNA-D	-	-	-	50	100	400	-	-	-
CMV-dCas9:KRAB	-	-	-	50	100	400	-	-	-
CMV-TALD:KRAB	-	-	-	-	-	-	50	100	400
pcDNA3	150	300	1200	50	100	400	100	200	800
kontrola transfekcije	10	25	100	10	25	100	10	25	100

Preglednica 16: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja specifičnosti CRISPR/Cas sistema in primerjavi učinkovitosti transkripcijske represije z različnimi sgRNK

Transfekcijska mešanica												
Plazmidi	vezavno mesto A				vezavno mesto B				vezavno mesto D			
	-	A	B	D	-	A	B	D	-	A	B	D
[a]-CMV-fLuc	50	50	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-
[b]-CMV-fLuc	-	-	-	-	50	50	50	50	-	-	-	-
[d]-CMV-fLuc	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50
mU6-sgRNA-A	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-
mU6-sgRNA-B	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50	-
mU6-sgRNA-D	-	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	50
CMV-dCas9:KRAB	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
pcDNA3	100	50	50	50	100	50	50	50	100	50	50	50

rLuc	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Preglednica 17: Količine plazmidov [ng], uporabljene pri eksperimentih testiranja specifičnosti in učinkovitosti več sgRNK molekul v isti celici s pretočno citometrijo

Transfekcijska mešanica					
	RNA-A	-	+	-	+
	RNA-B	-	-	+	+
Plazmidi					
[a]-CMV-TagBFP	250	250	250	250	250
[b]-CMV-mCitrine	250	250	250	250	250
mU6-sgRNA-A	-	250	-	250	250
mU6-sgRNA-B	-	-	250	250	250
CMV-dCas9:KRAB	500	500	500	500	500
pcDNA3	500	500	500	500	500
iRFP	100	100	100	100	100

8.2 Priloga B: Protokoli

8.2.1 Protokol I: Pomnoževanje plazmidov v celicah *E. coli*

1.1 Kemikalije

- tekoče LB gojišče
- trdo (agarno) LB gojišče
- ampicilin
- kanamicin
- MQ (destilirana voda)

1.2 Laboratorijski pribor

- skrinja
- avtomatske pipete
- nastavki za pipete
- mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- termoblok
- inkubator
- petrijevke
- hokejka
- parafilm
- hladilnik
- Nippon Genetics Fast Gene™ Plasmid Mini Kit
- centrifugirke
- centrifuga
- vibracijsko mešalo (vorteks)
- spektrofotometer ND-1000 NanoDrop
- računalnik
- čistilni robčki za čiščenje optičnih naprav Linsenpapier, Assistant

1.3 Organizmi

- bakterija *E.coli* seva DH5α

1.4 Metode

a) Transformacija bakterijskih celic

1. Zaradi dela z bakterijami je delo potekalo ob prižganem gorilniku.
2. Kompetentne celice *E. coli* seva DH5α, shranjene na -80 °C, odtalimo na ledu.
3. 100ng izbranih plazmidov odpipetiramo v označene mikrocentrifugirke s celicami.
4. Po približno 30 minutah inkubacije na ledu izvedemo na kompetentnih celicah toplotni šok na 42 °C s stresanjem pri 500 rpm.

5. Celice centrifugiramo 3 minute pri 7000 rpm.
6. Odlijemo del gojišča, tako da v mikrocentrifugirkah ostane poleg peleta celic približno 100 μ l gojišča.
7. Pelet celic resuspendiramo in prenesemo na trdna agarno LB gojišča z ustreznim antibiotikom (ampicilin oziroma kanamicin) in jih s hokejko razmažemo.
8. Gojišča z bakterijami inkubiramo na 37 °C, približno 24 ur.

b) Precepljanje v tekoče gojišče

1. Tekočem LB gojišču (10 ml) dodamo 10 μ l ustreznega antibiotika (ampicilin oziroma kanamicin) s koncentracijo 50 mg/ml.
2. Odpremo agarno ploščo s transformiranimi bakterijami.
3. Z nastavkom za pipeto se dotaknemo ene kolonije in ga odvržemo v tekoče gojišče.
4. Posodo z gojiščem zapremo in postavimo v stresalnik na 37 °C in 160 rpm.
5. Agarno gojišče zatesnimo s parafilmom in vrnemo v hladilnik.

c) Izolacija plazmidne DNK¹⁴

1. Po približno 16 urah inkubacije preverimo tekoča gojišča, če so se bakterije namnožile. To opazimo kot zadostno motnost gojišč.
2. Vsebino gojišč prelijemo v označene centrifugirke in jih centrifugiramo 2 minuti pri 12000 rpm.
3. Supernant odlijemo, tako da ostane le pelet bakterijskih celic.
4. Peletom v centrifugirkah dodamo 200 μ l mP1 in vorteksiramo.
5. V vsako centrifugirko dodamo 200 μ l mP2 in jih rahlo pretresemo.
6. Po štirih minutah dodamo še 300 μ l mP3 in centrifugirke zopet pretresemo.
7. Opazimo, da je nastala bela oborina.
8. Centrifugiramo za 2 minuti pri 13400 rpm.
9. Pripravimo in označimo 12 kolon ter 12 mikrocentrifugirk.
10. V kolone odpipetiramo supernatant.
11. Centrifugiramo za 30 sekund pri hitrosti 13400 rpm.
12. Ostanek, ki se je nabral v koloni, odlijemo in dodamo 300 μ l mP4.
13. Ponovno centrifugiramo za 30 sekund pri 13400 rpm.
14. Ostanek odlijemo in dodamo 600 μ l mP5.
15. Zopet centrifugiramo za 30 sekund pri 13400 rpm.
16. Ostanek odlijemo, centrifugiramo za 3 minute pri 13400 rpm .
17. Kolone prestavimo v epice, jim dodamo 50 μ l mP6 in jih 2 minuti pustimo na sobni temperaturi.

¹⁴ DNK smo izolirali po navodilih proizvajalca s kitom Nippon Genetics Fast Gene™ Plasmid Mini Kit, ki temelji na alkalni lizi celic ter vezavi plazmidne DNA na nosilec.

d) Spektrofotometrično preverjanje koncentracije DNK

1. Vključimo računalnik in spektrofotometer NanoDrop ter odpremo pripadajoči program ND-1000.
2. Čitalnik očistimo s 70 % etanolom, ga kalibriramo z vzorcem MQ ter nanj odpipetiramo vzorec brez DNK za določitev ničelne točke.
3. Po vsakem vzorcu z robčkom obrišemo vzorčno točko, naneseemo 1 μ l novega vzorca in izmerimo koncentracijo izoliranih plazmidov.
4. Ko zaključimo z delom, očistimo spektrofotometer in izključimo računalnik.

8.2.2 Protokol II: Delo s celičnimi kulturami

2.1 Kemikalije

- 70 % etanol
- tripsin
- gojišče (DMEM + 10 % FBS)
- PBS
- tripan modro barvilo
- NaCl

2.2 Laboratorijski pribor

- zaščitne rokavice, halja, kapa in copatki
- laminarij
- serološke pipete
- nastavki za pipete
- posodica za odpadke
- posodica za celice
- centrifugirka
- pipeta
- gojitvene plošče
- števna komora Countess
- naprava za štetje celic Countess

2.3 Organizmi

- celična linija HEK293T

2.4 Metode

a) Tripsinizacija celic HEK293T

1. S serološko pipeto odstranimo gojišče in nežno speremo s 5 ml PBS ter ga nato odstranimo iz gojitvene posodice.
2. Dodamo 2 ml tripsina in gojitveno posodico nekajkrat nežno zazibamo, da se celice odlepijo s površine.
3. Dodamo 10 ml gojišča (DMEM + 10 % FBS), ki inhibira tripsin, in celice nežno resuspendiramo s pipeto.
4. Suspenzijo prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 minut pri 1200 rpm.
5. Iz centrifugirke odstranimo gojišče, ga nadomestimo z 10 ml svežega (DMEM + 10 % FBS) in celice nežno resuspendiramo s pipeto.
6. 10 % suspenzije celic vrnemo v gojitveno posodico, ki jo predhodno speremo s 5 ml PBS, preostanek celic pa uporabimo za nacep na gojitvene plošče.

b) Štetje in nacepljanje celic HEK293T

1. 10 μ l barvila tripan modro dodamo pripravljeni 10 μ l suspenziji celic v mikrocentrifugirki.
2. V pripravljeno števno komoro odpipetiramo 10 μ l obarvanih celic in jo vstavimo v napravo za avtomatsko štetje celic Countess. Ta rezultat poda v celokupnem številu celic/ml, odstotek viabilnosti ter število mrtvih in živih celic. Za nadaljnje računanje uporabimo zgolj število živih celic.
3. Označimo prazne gojitvene plošče in v sterilni plastični posodici zmešamo izračunane volumne gojišča in celic.
4. Ustrezne volumne prenesemo v luknjice gojitvenih plošč.

Preglednica 18: Površina luknjice, število celic in volumen gojišča za različne gojitvene plošče

Število luknjic	Površina luknjice [cm ²]	Število celic/luknjico	Volumen gojišča/luknjico [ml]
8	1	100000	0,25
12	3,8	250000	1
96	0,14	50000	0,1

c) Prehodna transfekcija celične linije HEK293T

1. Približno 24 ur po nacepu celic v ustrezne gojitvene plošče izvedemo prehodno transfekcijo.
2. Pripravimo načrt in izračunamo potrebne volumne plazmidov na podlagi števila paralelk ter založne koncentracije plazmidov.
3. Te zmešamo v ustreznem volumnu 150mM NaCl, kar je približna fiziološka koncentracija soli.
4. 20 minut pred transfekcijo dodamo v mešanico PEI¹⁵ (transfekcijski reagent) za volumen, ki smo ga izračunali glede na količino DNK. Tipična količina pripravljene raztopine PEI je 6 μ l/500ng DNK.
5. V laminariju odpipetiramo pripravljene transfekcijske mešanice v luknjice nacepljenih plošč po pripravljenem načrtu.
6. Po končani transfekciji vrnemo plošče v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂.

Preglednica 19: Število luknjic, maksimalna količina DNK in volumen transfekcijske mešanice za različne gojitvene plošče

Število luknjic	Maksimalna količina DNK [ng]	Volumen transfekcijske mešanice [μ l]
8	500	50
12	2000	100
96	250	20

¹⁵ PEI (polietilenimin) je transfekcijski reagent, ki DNK kondenzira v pozitivno nabite delce, zmožne vezave na površino celice, in vstopa vanjo z endocitozo.

8.2.3 Protokol III: Merjenje luciferazne aktivnosti

3.1 Kemikalije

- pufer za kresničkino luciferazo (2,6 ml 5xfLuc pufra, 130 µl DTT, 130 µl CoA, 130 µl ATP, 10,01 ml MQ)
- pufer za Renilla luciferazo (6,5 ml 2xrLuc pufra, 6,5 ml MQ)
- luciferin, raztopljen v 100 µl 100 % DMSO
- coelenterazin, raztopljen v 100 µl 100 % metanola
- komercialni lizni pufer
- MQ

3.2 Laboratorijski pribor

- alufolija
- falkonke
- vakuumaska črpalka
- Pasteurjeve pipete
- plošče 96-well
- laminarij
- pipete
- nastavki za pipete
- naprava za merjenje luciferazne aktivnosti Orion
- računalnik

3.3 Celične kulture

- celična linija HEK293T

a) Priprava pufrov za merjenje luciferazne aktivnosti

1. Ker merimo aktivnost dveh različnih luciferaz – kresničkine (reporter) in *Renilla* luciferaze (kontrola transfekcije), smo pripravili 2 različna pufra.
2. Komponente pufrov za merjenje aktivnosti kresničkine luciferaze in *Renilla* luciferaze hranimo na -20 °C ali -80 °C ter jih pred začetkom dela odtajamo na sobni temperaturi.
3. Po načrtu pripravimo pufra in pred začetkom merjenja dodamo potrebna substrata – luciferin za kresničkino in coelenterazin za *Renilla* luciferazo. Različna substrata omogočata merjenje obeh luciferaz hkrati.
4. Centrifugirke zavijemo v alufolijo, saj sta oba pripravljena pufra svetlobno občutljiva.

b) Liza celic

1. Zaradi dela v celičnem laboratoriju se je potrebno pravilno zaščititi in vse pripomočke razkužiti, kot je navedeno v protokolu II, 2.4 metode.

2. Iz transfeciranih gojitvenih plošč s 96 luknjicami z vakumsko črpalko previdno odsesamo medij iz luknjic.
3. Za lizo celic uporabimo komercialen lizni pufer, ki je pripravljen v petkratni koncentraciji. Iz tega razloga ga je potrebno razredčiti v sterilni MQ vodi do enkratne končne koncentracije.
4. Lizni pufer (30 μ l/luknjico) odpipetiramo v luknjice in gojitveno ploščo inkubiramo na sobni temperaturi za 10 minut.

c) Merjenje luciferazne aktivnosti

1. Luciferazno aktivnost merimo z luminometrom, ki ga upravljamo z računalniškim programom Simplicity 4.2.
2. Pred začetkom dela speremo injektorje z etanolom, MQ + 0.1 % DMSO in MQ.
3. Centrifugirke s pufri namestimo na injektorje, vstavimo lizirane gojitvene ploščice s 96 luknjicami in izmerimo aktivnost luciferaze.
4. Vedno najprej izmerimo aktivnost kresničkine luciferaze, šele nato aktivnost Renilla luciferaze, saj pH Renilla pufru deaktivira kresničkino luciferazo.

d) Analiza podatkov

1. Luminometer izmerjene vrednosti luciferazne aktivnosti poda v obliki absolutnih števil in jih izvozi v programu Microsoft Office Excel. Kot podatek za prikaz uporabimo relativne luciferazne enote (RLE) – tj. vrednosti kresničkine luciferaze (poročevalski protein), normalizirane na vrednosti Renilla luciferaze (kontrola učinkovitosti transfekcije) v istem vzorcu.
2. RLE izračunamo tako, da vrednosti kresničkine luciferaze delimo z vrednostmi Renilla luciferaze.
3. Eksperimente z luciferaznim poročevalcem izvedemo v 4 paralelkah, zato upoštevamo za prikaz končnih rezultatov povprečje 34 paralelk.
4. V primeru velikih odstopanj izločimo eno od vrednosti.
5. Na grafih prikažemo tudi standardne odklone upoštevanih vrednosti.

8.2.4 Protokol IV: Fluorescentna mikroskopija

4.1 Kemikalije

4.2 Laboratorijski pribor

- konfokalni mikroskop
- plošča 8-well

4.3 Celične kulture

- celična linija HEK293T

a) Mikroskopija

1. Mikroskopirne komore s predhodno transfeciranimi celicami položimo na mizico mikroskopa, osvetlimo vzorec in prilagodimo fokus.
2. Mikroskop upravljamo z računalniškim programom Leica LasAF. Fluorescentni protein mCitrine vzbujamo s 514 nm lasersko linijo 100 mW argonskega laserja pri 25 % laserske moči ter oddano svetlobo detektiramo med 520 in 560 nm. Fluorescentni protein mCherry (kontrola transfekcije) vzbujamo z 1 mW 543 nm HeNe laserjem ter oddano svetlobo detektiramo med 590 in 630 nm.
3. Moč laserjev prilagodimo glede na svetilnost fluorescentnih proteinov v vzorcu.
4. Vse nastavitve na mikroskopu pri določeni povečavi (z izjemo fokusa) morajo ostati enake od prvega do vključno zadnjega dne, saj to omogoči primerjanje vzorcev med seboj.
5. V vsakem vzorcu posnamemo vsaj 5 slik.
6. Po koncu snemanja ugasnemo mikroskop in računalnik ter mikroskopsko komoro vrnemo v inkubator na 37 °C in 5 % CO₂.

b) Analiza podatkov

1. Slike kvantificiramo z računalniškim programom LasAF, ki poda povprečne vrednosti intenzitete posameznih slikovnih pik (pikslov) na posneti sliki.
2. Vrednosti intenzitete fluorescence mCitrine (poročevalski protein) normaliziramo na vrednosti fluorescence mCherry (kontrola transfekcije). Tako dobimo relativne fluorescenčne enote (RFE).
3. Za posamezne vzorce upoštevamo povprečja in standardne odklone 5 posnetih slik.
4. Slike obdelamo s programom za obdelavo mikroskopskih slik ImageJ, pri čemer upoštevamo enake spremembe pri vseh primerjanih slikah.

8.2.5 Protokol V: Pretočna citometrija

5.1 Kemikalije

- gojišče
- PBS pufer

5.2 Laboratorijski pribor

- gojitvene plošče
- led
- pipete
- nastavki za pipete
- kivete
- pretočni citometer
- računalnik in programoma FloMax in FlowJo
- 488-nm, 405-nm in 633-nm diodni laser

5.3 Celične kulture

- celična linija HEK293T

a) Pretočna citometrija

1. Prehodno transfecirane celice v gojitvenih ploščah z 12 luknjicami prenesemo na led, jim odstranimo gojišče ter jih s curkom pipete odlepimo s podlage in resuspendiramo v 500 µl ohlajenega PBS pufra.
2. Suspenzijo celic prenesemo v plastične kivete in vanje dodamo še približno 2ml PBS pufra.
3. Prižgemo računalnik in zaženemo program FloMax.
4. Vsako kiveto posebej natakemo na vzorčno točko pretočnega citometra.
5. Fluorescentni protein mCitrine detektiramo s 488-nm diodnim laserjem, fluorescentni protein TagBFP s 405 nm diodnim laserjem in fluorescentni protein iRFP (kontrola transfekcije) s 633 nm diodnim laserjem.
6. V vsakem vzorcu analiziramo vsaj 30000 iRFP pozitivnih celic.

b) Analiza podatkov

1. Po končanem delu obdelamo podatke z računalniškim programom FlowJo.
2. V vzorcu netransfeciranih celic gledamo na stransko in direktno sipanje svetlobe, določimo populacijo živih celic in izberemo enako populacijo pri vseh ostalih vzorcih.
3. Za nadaljnjo analizo uporabimo v teh populacijah le iRFP pozitivne celice (kontrola učinkovitosti transfekcije).