

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Dejan PEZDIREC

**VREDNOTENJE IZBIJANJA GENOV V SESALSKIH
CELICAH S TEHNOLOGIJO NUKLEAZE Z MOTIVI
CINKOVIH PRSTOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Dejan PEZDIREC

**VREDNOTENJE IZBIJANJA GENOV V SESALSKIH CELICAH S
TEHNOLOGIJO NUKLEAZE Z MOTIVI CINKOVIH PRSTOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**EVALUATION OF GENE SILENCING WITH TECHNOLOGY OF ZINC FINGER
NUCLEASE IN MAMMAL CELLS**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje, Molekulske biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratorijih oddelka Celična in molekularna biologija v Biofarmaceutiki farmacevtske družbe Lek, d. d., ki je član skupine Sandoz.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha, za somentorja dr. Dominik Gaserja iz farmacevtske družbe Lek, d. d. in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut

Recenzentka: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 7. december 2015

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskani različici. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Dejan Pezdirec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 575.11:615.32(043.2)=163.6
KG utišanje genov/motivi cinkovih prstov/CHO/siRNA
AV PEZDIREC, Dejan
SA ANDERLUH, Gregor (mentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije
LI 2015
IN VREDNOTENJE IZBIJANJA GENOV V SESALSKIH CELICAH S
TEHNOLOGIJO NUKLEAZE Z MOTIVI CINKOVIH PRSTOV
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XI, 81 str., 15 pregl., 42 sl., 0 pril., 58 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Učinkovitost in varnost bioloških zdravil je poleg ustrezne aminokislinske zgradbe večinoma odvisna tudi od posttranslacijskih modifikacij, v katere je vključenih veliko različnih celičnih proteinov. Z načrtnim izničenjem genov, ki pripomorejo k nastanku neželenih struktur, lahko izboljšamo varnost in učinkovitost biološkega zdravila, ki ga proizvaja tako modificirana gostiteljska celica. Cilj magistrskega dela je bil vrednotenje uspešnosti izbijanja ciljnega gena s tehnologijo nukleaz z motivi cinkovih prstov (ZFN) pri različnih derivatih celic CHO. Gen za nukleazo z motivi cinkovih prstov smo v celice vnesli v obliki plazmidne DNA, z metodo nukleofekcije. Gen se v sesalskih celicah izrazi v obliki aktivnega proteina, ki se ob pomoči motivov cinkovih prstov specifično veže na ciljno nukleotidno zaporedje ter na mestu vezave povzroči prekinitve dvojne vijačnice. Ta sproži popravljalne mehanizme, kot sta nehomologno združevanje koncev in homologna rekombinacija. Na prostih koncih lahko pride do insercij, delecij ali preurejanja nukleotidnega zaporedja. Pri večjih spremembah gena se premakne bralni okvir in posledično se protein ne izrazi. Po postopku kloniranja in izolaciji celokupne genomske DNA izoliranih klonov smo z nukleaznim testom Cel-I in kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) preverili prisotnost mutacij na ciljnem genu in ovrednotili uspešnost utišanja genov z metodo ZFN. Z uporabo nukleaze z motivi cinkovih prstov nam je uspelo vplivati na en alel ciljnega gena pri 10 % klonov obeh celičnih linij. Iz rezultatov števila kopij ciljnega gena je razvidno, da je učinkovitost metode odvisna od ploidnosti celične linije. Po obdelavi rezultatov smo ugotovili, da sta metodi nukleazni test Cel-I in qPCR primerljivi in da lahko zadnja preprosto nadomesti veliko bolj pogosto uporabljeni nukleazni test. Metoda izbijanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov je eno izmed primernih molekularnih orodij za izbijanje ciljnih genov pri sesalskih celicah, pri čemer moramo upoštevati ploidnost celic, generirati večje število klonov (>200) ali izbrane klone ponovno transficirati z ZFN.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDK 575.11:615.32(043.2)=163.6
CX gene silencing/zinc finger nuclease/CHO/siRNA
AU PEZDIREC, Dejan
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study of molecular biology
PY 2015
TI EVALUATION OF GENE SILENCING WITH TECHNOLOGY OF ZINC FINGER NUCLEASE IN MAMMAL CELLS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 81 p., 15 tab., 42 fig., 0 ann., 58 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The efficiency and safety of biopharmaceutical products depends on the amino acid sequence and the on post-translation modifications of the protein. With targeted gene knock out of the cellular proteins which which contribute to the formation of undesirable structures the safety and efficacy of the biopharmaceutical products, produced by a modified host cell can be improved. The aim of the master thesis was the evaluation of the successful disruption of the target gene with the zinc finger nuclease technology in different CHO cell derivatives. The zinc finger nuclease genes for specific gene knock out were introduced to the host cell with plasmid DNA by nucleofection. After the expression of zinc finger nucleases from the plasmid integrated in the genome of the host cell, they bind to the target nucleotide sequence resulting in double-strand break. Gene disruption results in site-specific mutagenesis which is followed by cell's natural DNA-repair processes, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ), resulting in deletions, integrations or modifications, which can cause a shift in the reading frame. Following the procedure of cloning and extraction of genomic DNA from isolated clones, we used a nuclease test Cel-I and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) to detect mutations of target gene. By using ZFN method we did not successfully generate a population of cells with completely knock-out targeted gene. 10 % of generated clones had significantly down regulated expression of the targeted gene (evaluated by qPCR), which was caused by single-allele disruption. Due to evaluated results, qPCR method is comparable with more popular mutation detection system - nuclease test Cel-I. ZFN is one of the suitable technology for gene editing. Due to incomplete targeted gene disruption the second round of ZFN transfection in positive detected clones could be applied. It is important to choose a suitable cell line - we observed higher expression in the cells which were triploids.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	X
1 UVOD	1
1.1 PREGLED OBJAV	2
1.1.1 Biološka zdravila	2
1.1.2 Sesalske celice.....	3
1.1.3 Regulacija izražanja genov	5
1.1.3.1 Interferenca RNA	7
1.1.3.2 Tehnologija nukleaz z motivi cinkovih prstov	7
1.1.3.2.1 Nukleaze	8
1.1.3.2.2 Cinkovi prsti	9
1.1.3.2.3 Princip delovanja nukleaz z motivi cinkovih prstov	11
1.1.4 Plazmidni vektorji	13
1.1.5 Nukleazni test Cel-I (Surveyor mutation detection kit, Transgenomic)	15
1.1.6 Verižna reakcija s polimerazo	18
1.1.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	19
1.1.7.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov	22
1.1.7.2 Specifične metode določanja pomnožkov	23
1.1.7.3 Začetni oligonukleotidi in sonde	24
1.1.7.4 Kvantifikacija	25
1.2 NAMEN DELA.....	25
1.3 HIPOTEZE.....	26
2 MATERIAL IN METODE.....	27
2.1 MATERIAL	27

2.2 METODE	31
2.2.1 Načrt poskusov	31
2.2.2 Odmrzovanje sesalskih celic	32
2.2.3 Vzorčenje suspenzije sesalskih celic na aparaturi Vi-cell XR	32
2.2.4 Kultivacija suspenzije sesalskih celic	32
2.2.5 Transfekcije	33
2.2.5.1 Priprava vektorja	33
2.2.5.2 Transfekcije sesalskih celic	34
2.2.6 Kloniranje	34
2.2.6.1 Nacepitev sesalskih celic v poltrdni rastni medij	35
2.2.6.2 Kloniranje z robotom Clone Pix FL	35
2.2.7 Gojenje sesalskih celic v mikrotitrskih ploščicah	35
2.2.8 Priprava celičnih peletov za izolacijo gDNA	36
2.2.9 Izolacija gDNA z robotom QIAcube in kompletom reagentov QIAmp Blood Mini	37
2.2.10 Spektrofotometrično določanje koncentracije izolirane gDNA	37
2.2.11 Tehnologija nukleazni test Cel-I (Mutation detection kit, Surveyor)	38
2.2.11.1 Raztapljanje oligonukleotidnih začetnikov PCR	38
2.2.11.2 Optimizacija temperature prileganja začetnih oligonukleotidov	38
2.2.11.3 Elektroforeza na agaroznem gelu	40
2.2.11.4 Namnoževanje PCR-produkta	41
2.2.12 Preverjanje števila kopij gena s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času	44
2.2.12.1 Začetni oligonukleotidi in sonde	44
2.2.12.2 Priprava reakcij	45
2.2.12.3 Potek reakcij	47
2.2.12.4 Obdelava podatkov	47
3 REZULTATI	49
3.1 OPTIMIZACIJA PCR	49
3.2 NUKLEAZNI TEST Cel-I	59

3.2.1 Primerjava nukleaznega testa Cel-I in metode qPCR na mešani populaciji celic za testiranje delovanja ZFN	59
3.3.2 Rezultati analize zaznavanja mutacij pri klonih celične linije CHO Der2 z nukleaznim testom Cel-I	61
3.4 REZULTATI ANALIZE ZAZNAVANJA MUTACIJ PRI KLONIH CELIČNIH LINIJ CHO Der2 IN CHO Der3 s qPCR	62
4 RAZPRAVA.....	68
5 SKLEPI	74
6 POVZETEK.....	75
7 VIRI	77

KAZALO SLIK

Sl.1: CHO-celice v suspenziji (Jamiri, 2007).....	4
Sl.2: Aminokislinsko zaporedje TFIIIA z devetimi cinkovimi prsti (Rhodes in Klug, 1993)	9
Sl.3: Cinkov prst (Rhodes in Klug, 1993)	9
Sl.4: Shematski prikaz strukture cinkovega prsta (Garland science, 2012)	10
Sl.5: Shematski prikaz dimerjev nukleaz z motivi cinkovih prstov (Biowire, 2010).....	11
Sl.6: Popravljalni mehanizmi; HR – homologna rekombinacija, NHEJ – nehomologno združevanje koncev (Biowire, 2010).....	13
Sl.7: Shematski prikaz vektorja (avtorska shema).....	14
Sl.8: Delovanje endonukleaze Cel-I (povzeto po www.transgenomic.com , 2013).....	16
Sl.9: Analiza fragmentov na agaroznem gelu po obdelavi s Cel-I (povzeto po www.transgenomic.com , 2013).....	17
Sl.10: Krivulja emisije fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (povzeto po http://www.appliedbiosystems.com , 2012).	20
Sl.11: Relativna standardna krivulja real time PCR (http://www.appliedbiosystems.com , 2012)	22
Sl.12: Hidroliza TaqMan-sonde (povzeto po http://www.appliedbiosystems.com , 2012)	24
Sl.13: Shema poskusa izbivanja gena z uporabo ZFN (avtorska shema).....	31
Sl.14: Standard velikosti 100 baznih parov (www.neb.com , 2012)	41
Sl.15: E-gel 1, Oligonukleotidni par 1, pričakovana velikost 86 bp	50
Sl.16: E-gel 2, Oligonukleotidni par 2, pričakovana velikost 120 bp	50
Sl.17: E-gel 3, Oligonukleotidni par 3, pričakovana velikost 68 bp	50
Sl.18: E-gel 4, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp	50
Sl.19: E-gel 5, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp	51
Sl.20: E-gel 6, Oligonukleotidni par 1, pričakovana velikost 86 bp	52
Sl.21: E-gel 7, Oligonukleotidni par 2, pričakovana velikost 120 bp	52
Sl.22: E-gel 8, Oligonukleotidni par 3, pričakovana velikost 68 bp	53
Sl.23: E-gel 9, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp	53
Sl.24: E-gel 10, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp	53
Sl.25: E-gel 11, Oligonukleotidni par 1, pričakovana velikost 86 bp	55
Sl.26: E-gel 12, Oligonukleotidni par 2, pričakovana velikost 120 bp	56
Sl.27: E-gel 13, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp	56
Sl.28: E-gel 14, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp	57
Sl.29: E-gel 15, PCR-produkt izbranega para začetnih oligonukleotidov.....	58
Sl.30: E-gel 16, preverjanje delovanja ZFN na mešani populaciji CHO Der2 z nukleaznim testom Cel-I	59
Sl.31: Primerjava števil kopij ciljnega gena pri mešani populaciji	60
Sl.32: Rezultati nukleaznega testa Cel-I na ravni klonov.....	61
Sl.33: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 1. do 29. derivata celične linije CHO Der2.....	63
Sl.34: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 30. do 59. derivata celične linije CHO Der2.....	63

Sl.35: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 60. do 161. derivata celične linije CHO Der2.....	64
Sl.36: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in vseh 85 klonov derivata celične linije CHO Der2.....	64
Sl.37: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 1. do 22. derivata celične linije CHO Der3.....	65
Sl.38: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 23. do 51. derivata celične linije CHO Der3.....	65
Sl.39: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 52. do 84. derivata celične linije CHO Der3.....	66
Sl.40: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 85. do 106. derivata celične linije CHO Der3.....	66
Sl.41: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 107. do 144. derivata celične linije CHO Der3.....	67
Sl.42: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in vseh 109 klonov derivata celične linije CHO Der3.....	67

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl.1: Kemikalije, uporabljene pri delu.....	27
Pregl.2: Uporabljena laboratorijska oprema.....	28
Pregl.3: Restriksijska mešanica.....	33
Pregl.4: Seznam izvedenih transfekcij.....	34
Pregl.5: Število pridobljenih klonov od kloniranja do rastnih platenk.....	36
Pregl.6: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih med optimizacijo temperature.....	38
Pregl.7: Reakcijska mešanica za eno reakcijo PCR.....	39
Pregl.8: Programa, uporabljena pri optimizaciji temperature začetnih oligonukleotidov.....	39
Pregl.9: Shematski prikaz obeh temperaturnih gradientov (50–60 °C in 60–70 °C).....	40
Pregl.10: Mešanica za nanos na elektroforezni gel.....	40
Pregl.11: PCR-program, uporabljen pri pomnoževanju produkta na ravni klona.....	42
Pregl.12: Program hibridizacije.....	43
Pregl.13: Začetni oligonukleotidi in sonda za qPCR.....	45
Pregl.14: Sestava qPCR reakcijske mešanice na 384 mikrotitrski ploščici.....	46
Pregl.15: Pogoji pomnoževanja pri metodi qPCR.....	47

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ATP	adenozin trifosfat
BHK	celična linija iz ledvičnih celic mladička hrčka (<i>angl.</i> baby hamster kidney)
Bp	bazni par (<i>angl.</i> base pair)
cDNA	komplementarna DNA (<i>angl.</i> complementary DNA)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (<i>angl.</i> chinese hamster ovarium)
Cp	presečišče (<i>angl.</i> crossing point)
Cq	pražni cikel (<i>angl.</i> quantitative cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidni trifosfat (<i>angl.</i> deoxynucleotide triphosphate)
DSB	prelom dvojne vijačnice (<i>angl.</i> double strand break)
EMA	Evropska agencija za zdravila
FAM	6-karboksi fluorecin – reporterski fluorogen
FP	smiselni začetni oligonukleotid (<i>angl.</i> forward primer)
FRET	fluorescentno resonančni prenos energije (<i>angl.</i> fluorescence resonance energy transfer)
g	centrifugalna sila
gDNA	genomska DNA
GFP	zeleni fluorescirajoči protein (<i>angl.</i> green fluorescent protein)
GLUC	glukagon
HR	homologa rekombinacija (<i>angl.</i> homologous recombination)
kbp	tisoč baznih parov (<i>angl.</i> kilobase pair)
MBK	mikrobiološka komora
miRNA	mikro RNA (<i>angl.</i> micro RNA)
mRNA	informacijska RNA (<i>angl.</i> messenger RNA)
NHEJ	nehomologno združevanje koncev (<i>angl.</i> non homologous end joining)
NTC	negativna kontrola (<i>angl.</i> no-template control)
ORI	mesto začetka podvajanja (<i>angl.</i> origin of replication)
PBS	fosfatni pufer (<i>angl.</i> phosphate buffered saline)

PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
pDNA	plazmidna DNA
qPCR	kvantitativni PCR (<i>angl.</i> quantitative PCR)
RNA	ribonukleinska kislina
RNAi	interferenčna RNA (<i>angl.</i> RNA interfering)
RNaza	ribonukleaza
RP	protismiselni začetni oligonukleotid (<i>angl.</i> reverse primer)
rpm	obrati na minuto (<i>angl.</i> revolutions per minute)
RT-qPCR	kvantitativni PCR z reverezno transkripcijo (<i>angl.</i> reverse transcription quantitative PCR)
siRNA	mala interferenčna RNA (<i>angl.</i> short interfering RNA)
SOP	standardni operacijski postopek
TAMRA	6-karboksi-tetrametil-rodamin – zaviralni fluorogen/dušilec
UNG	uracil-DNA-N-Glikozilaza
ZFN	nukleaza z motivom cinkovih prstov (<i>angl.</i> zinc finger nuclease)

1 UVOD

V zadnjih dveh desetletjih je v farmaciji čedalje pomembnejša proizvodnja rekombinantnih učinkovin, ki jih uporabljamo kot terapije in cepiva (Shin in sod., 1997). Za pridobivanje rekombinantnih proteinov v terapevtske namene so sesalske celice, predvsem zaradi zmožnosti pravilnega zvitja proteina in posttranslacijskih modifikacij, prevladujoči ekspresijski sistem (Wurm in sod., 2004; Jiang in sod., 2006). Največkrat se za proizvodnjo glikoziliranih terapevtskih proteinov, predvsem terapevtskih protiteles, nekaterih hormonov in hematopoetskih rastnih dejavnikov (citokini, eritropoetin) uporabljajo ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO) (Štrukelj in Kos, 2007). Aminokislinsko zaporedje biološkega zdravila je odvisno od nukleotidnega zaporedja, ki ga vnesemo v gostiteljsko celico. Učinkovitost in varnost bioloških zdravil je poleg pravilnega aminokislinskega zaporedja večinoma odvisna tudi pravilnega zvijanja in sestavljanja proteinov in posttranslacijskih modifikacij, v katere je vključenih veliko različnih celičnih proteinov. S poznavanjem molekularnih mehanizmov lahko genetsko modificiramo gostiteljsko celico. Na ta način vplivamo na zmanjšanje izražanja ali uničenje genov, ki pripomorejo k nastanku neželenega produkta in tako izboljšamo varnost in učinkovitost biološkega zdravila. Stopnji transkripcije pripisujejo prevladujoči pomen pri kontroli izražanja genov (Jiang in sod., 2006), zato smo izbrali metodo, ki deluje že na stopnji transkripcije in omogoča specifično in učinkovito prekinitev bralnega okvirja ciljnega gena. Za modifikacijo ciljnega gena, katerega imena in nukleotidnega zaporedja zaradi tehnološko-komercialnih razlogov ne moremo razkriti, smo uporabili nukleaze z motivi cinkovih prstov. Po vnosu gena za nukleazo z motivi cinkovih prstov v obliki plazmidne DNA z metodo nukleofekcije se ta izrazi v obliki aktivnega proteina in se nato s pomočjo motivov cinkovih prstov specifično veže na ciljno nukleotidno zaporedje ciljnega gena ter na mestu vezave povzroči prekinitev dvojne vijačnice. Različne proteinske podenote zaznajo dvojne prelome in aktivirajo popravljalne mehanizme. Med popravljanjem dvojnih vijačnic lahko pride do integracije ali izgube nukleotidov ali daljših odsekov, zato se nukleotidno zaporedje spremeni. Posledica so lahko nastanek zgodnejšega terminacijskega kodona, delecija aminokislin znotraj bralnega okvirja ali premik bralnega okvirja. Če nastanejo spremembe v nekaj nukleotidih, protein še vedno nastaja, ampak z manjšo

spremembo aminokislin, pri premiku bralnega okvirja pa nastane nefunkcionalen protein. Z laboratorijskim poskusom bi radi ovrednotili uspešnost genetske modifikacije rekombinantnega proteina z uporabo nukleaz z motivi cinkovih prstov. Po vnosu genskega konstrukta za nukleaze z motivi cinkovih prstov v obliki plazmidne DNA, kloniranju in izolaciji celotne genomske DNA smo z metodama nukleazni test Cel-I (Surveyor mutation detection kit) in qPCR (kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času) ovrednotili uspešnost modifikacije ciljnega gena.

1.1 PREGLED OBJAV

1.1.1 Biološka zdravila

Evropska agencija za zdravila (EMA) opredeljuje biološka zdravila kot tista, katerih zdravilna učinkovina je biološka snov. Vir bioloških snovi so mikroorganizmi, rastline, živali, človek ali pa jih pridobivamo s pomočjo celičnih kultur. V primerjavi s kemijsko sintetiziranimi zdravili je proizvodnja sodobnega biološkega zdravila tehnološko zahtevnejša in dolgotrajnejša. V povprečju je potrebnih od 8 do 9 mesecev od priprave prve celične kulture do nastanka biološke učinkovine. Od 5 do 7 let traja razvoj od priprave genskega konstrukta do proizvodnje prve serije zdravil za prodajo. Pomembno je, da so vse stopnje razvoja natančno kvalitativno in kvantitativno nadzorovane s predpisanimi standardnimi operacijskimi postopki (SOP), vsi parametri, od tehnik, aparaturnih sistemov in produkcijskega okolja, pa morajo biti natančno dokumentirani (Štrukelj in Kos, 2007).

Biološka zdravila v glavnem vsebujejo proteinske molekule ali nukleinske kisline, ki:

- a) imajo veliko molekulsko maso,
- b) imajo kompleksno tridimenzionalno zgradbo,
- c) so proizvedene s pomočjo celičnih kultur (zato je vse stopnje procesa proizvodnje v celoti težko nadzorovati),
- d) so pogosto heterogene molekule,

- e) jih v celoti zelo težko ovrednotimo s fizikalno-kemijskimi analitičnimi metodami in določimo njihovo biološko učinkovitost,
- f) so lahko imunogene (po vnosu v človeško telo izzovejo imunski odziv).

Biološka zdravila lahko razdelimo na pet večjih razredov:

1. biološka zdravila, pridobljena s sintezo (sintezni peptidi - vazopresin, kalcitonin);
2. biološka zdravila, pridobljena z izolacijo (učinkovine iz rastlin - alkaloidi, antioksidanti; živali, človeške krvi - inzulin, rastni hormon);
3. genske učinkovine (geni vstavljeni v vektor za vnos v organizem s pomočjo virusnega ali nevirusnega vnosa - ribozimi, učinkovine RNAi);
4. monoklonska protitelesa, pridobljena s klasično hibridomsko tehnologijo;
5. rekombinantna biološka zdravila (rekombinantni proteini, rekombinantna monoklonska protitelesa in rekombinantna cepiva - rekombinantni ertitropoetin, rekombinantni rastni faktorji, rekombinantni inzulin).

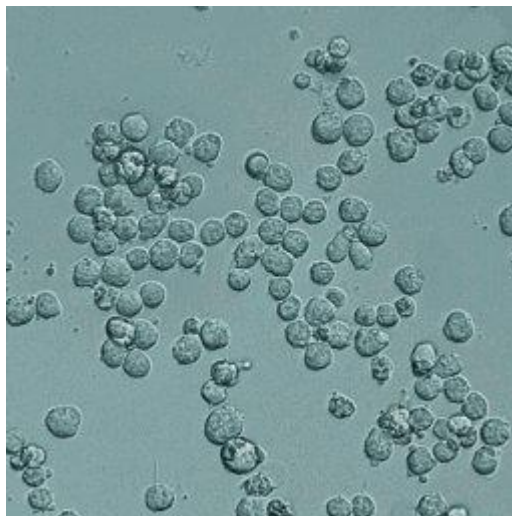
Večino sodobnih bioloških zdravil uvrščamo med rekombinantna biološka zdravila. Največ bioloških zdravil se razvija na področju rakavih obolenj, kar ni presenetljivo, saj je povečano število rakavih obolenj v razvitem svetu izjemno velik etični, medicinski in ekonomski problem. Temu sledijo odkritja novih učinkovin na področju infektivnih bolezni, avtoimunskih motenj, okužb s HIV, kardiovaskularnih obolenj, odpravo motenj pri genskih in nevroloških motnjah (Štrukelj in Kos, 2007).

1.1.2 Sesalske celice

V zadnjih desetletjih je gensko inženirstvo odprlo pot do uporabe rekombinantnih proteinov v terapevtske namene. S tem se je povečala potreba po učinkovitih ekspresijskih sistemih (Štrukelj in Kos, 2007). Delež rekombinantnih bioloških zdravil, proizvedenih v ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO), je okoli 30 odstotkov, med terapevtskimi rekombinantnimi protitelesi, ki so izredno velika skupina med biološkimi zdravili, je ta delež kar 50 odstotkov (Omasa in sod., 2010). Celice CHO so tako postale standarden sistem za proizvodnjo

rekombinantnih proteinov (Durocher in Butler, 2009). Pri proizvodnji rekombinantnih učinkovin s proizvodnimi organizmi prevlada kriterij varnosti, zaradi uporabe pri ljudeh. Pomembno je, da je rekombinantni protein čim bolj podoben naravnemu. Proizvodnja bioloških zdravil je za zdaj omejena predvsem na bakterije *Escherichia coli*, kvasovke ali sesalske celice (Štrukelj in Kos, 2007).

Celične linije, ki izvirajo iz živalskih celic, lahko pridobimo iz tkiv in jih v umetnih razmerah gojimo zunaj telesa (*in vitro*). Zagotoviti moramo primerna hranila in okoliščine. Proces gojenja omogoča posamezni celici živeti kot neodvisni enoti, podobno kot mikroorganizmu, npr. bakteriji ali glivi. Celice so v kulturi zmožne rasti in se deliti, dokler tega ne prekine kakšen pomemben dejavnik, ki se med gojenjem porablja oz. spreminja (rastni medij). Celične linije, ki izvirajo iz živalskih celic, so ekspresijski sistem, ki omogočajo posttranslacijske modifikacije, najbolj podobne človeškim. V biofarmacevtskih proizvodnih procesih sta se uveljavili liniji CHO in BHK (ledvične celice mladiča hrčka) (Štrukelj in Kos, 2007). Za izražanje rekombinantnih učinkovin se uporabljajo predvsem ovarijske celice kitajskega hrčka (slika 1).



Slika 1: CHO-celice v suspenziji (Jamiri, 2007)

Rast navadno poteka v določenih okoliščinah, kot je 37 °C s pribitkom ogljikovega dioksida. V rastnem mediju sta pomembni vrednost pH in koncentracija glukoze in drugih hranil. Ker celice rastejo v suspenziji, je eden izmed parametrov tudi stresanje kulture, kar omogoča boljšo dostopnost hranil in plinov. Kakovost glikozilacijskega profila se razlikuje pri različnih derivatih celičnih linij, ki rastejo v različnih okoliščinah in različnih rastnih medijih (Štrukelj in Kos, 2007).

Celice CHO lahko prilagodimo na rast v suspenzijskih rastnih medijih brez prisotnih živalskih komponent, poznamo preproste načine za vnos genov ter za namnoževanje in selekcijo klonov, ki proizvajajo velike količine rekombinantne učinkovine (Butler, 2005). Omogočajo tudi izločanje ustrezno zvitih in ustrezno glikoziliranih proteinov v rastne medije, ki so kompatibilni in bioaktivni v ljudeh (Werner in sod., 2007).

Mehanski stres, sestava rastnega medija in pretok plinov lahko močno vplivajo na rast CHO-celic, kar se meri z gostoto celic v suspenziji. Vpliv na rast celične kulture se kaže na končnem produktu – nižji kvantiteta in kvaliteta produkta (Štrukelj in Kos, 2007).

1.1.3 Regulacija izražanja genov

Regulacija izražanja genov je celična kontrola nastanka funkcionalnega produkta gena v zadostni količini in v točno določenem času. Funkcionalni produkt gena sta RNA in protein. Znanih je veliko mehanizmov, ki uravnavajo izražanje proteinskih kodirajočih genov. Pri genskem izražanju je lahko uravnan katerikoli korak, od transkripcije, translacije in tudi posttranslacijske spremembe proteina. Genska regulacija omogoči celici kontrolo nad strukturo in funkcijo in je podlaga za celično diferenciacijo, morfogenezo, spremenljivost in prilagoditev pri kateremkoli organizmu (Lewin B., 2000).

Modifikacija genov *in vivo* omogoča zdravljenje številnih patološko-fizioloških obolenj z inhibicijo sinteze proteinov, ki so vpleteni v razvoj bolezni. Na ta način gen, ki kodira vpleteni protein, modificiramo, ne da bi pri tem uničili organizem. Pri tem uporabljamo različno tehnologijo, kot sta na primer tehnologija interferenčne RNA (RNAi), pri kateri je učinek modifikacije genoma prehodan, ali tehnologija nukleaz z motivi cinkovih prstov (ZFN – *zinc*

finger nuclease), pri kateri se lahko trajno okvari gen (Bannasser in sod., 2005; Lee Y. in sod., 2004).

1.1.3.1 Interferenca RNA

Interferenca RNA je eno najpomembnejših odkritij na področju molekularne biologije v zadnjih 20 letih. Je oblika posttranskripcijskega utišanja genov, ki je posledica delovanja kratkih dvoverižnih molekul RNA, imenovana tudi mala interferenčna RNA (siRNA). Pot delovanja RNA-interference deluje prek procesiranja dolgih dvoverižnih RNA (dsRNA) z RNazi III podobnim encimom Dicer, ki katalizira cepitev dsRNA na ~ 25 nukleotidov dolge fragmente – siRNA. Omogoča tudi cepitev tako imenovanih lasničnih prekurzorjev (shRNA) na fragmente siRNA (McManus in Sharp, 2002). Komplementarna zaporedja siRNA se vežejo na molekule mRNA in sprožijo proces njihove razgradnje, zato se protein ne more sintetizirati. Tehnologija se uporablja pri analizi funkcije genov, analizi metabolnih poti, genskem kartiranju in zdravljenju bolezni (Buchon N., Vaury, 2006).

Nevarnosti pri uporabi RNAi so lahko:

- a) Zaradi delne komplementarnosti lahko pride do nespecifične vezave ali t. i. učinka off target, kar povzroči utišanja neciljnega gena.
- b) Ob zasičenosti mehanizma RNAi, vstopajo molekule siRNA v naravne celične poti miRNA in lahko motijo njihovo regulatorno vlogo.
- c) RNAi le utiša in ne izniči izražanja genov, kar je za zdravljenje nekaterih bolezni dovolj, pri drugih pa se samo zmanjša napredovanje bolezni (Jiang Z. in sod., 2006).

1.1.3.2 Tehnologija nukleaz z motivi cinkovih prstov

Nukleaze z motivi cinkovih prstov so razvili Chandrasegaran in sod. (Kim in sod., 1996; Chandrasegaran in Smith, 1999). Njihova prva uporaba za izbijanje genov je bila opisana leta 1994, ko so jih Choo in sod. uporabili za izbijanje onkogenov v mišji celični liniji (Choo in sod., 1994). So inženirsko napredni encimi, ki se specifično vežejo na dvoverižno DNA gostiteljske celice in naredijo rez na obeh verigah tarčnega zaporedja.

Kompleks nukleaze z motivi cinkovih prstov gradita dve funkcionalni domeni – vezavno specifična domena iz proteinov cinkovih prstov (*ZF-protein*) in katalitično aktivna domena. Protein cinkovega prsta lahko prepozna največ 3 bazne pare nukleotidnega zaporedja, zato se specifičnost poveča na 12 do 18 bp z zaporedno vezavo od 4 do 6 domen (Biowire, 2010). Katalitično aktivna domena je nukleaza *FokI*, restrikcijska endonukleaza tipa II.

1.1.3.2.1 Nukleaze

Nukleaze so encimi, ki specifično katalizirajo hidrolizo fosfodiesterških vezi v nukleinskih kislinah. Delimo jih v dve skupini, endonukleaze in eksonukleaze. Zadnje katalizirajo odcepitev končnih nukleotidov in se ločijo odvisno od smeri delovanja (5' ali 3'), endonukleaze pa hidrolitično cepijo notranje fosfodiesterške vezi. Najbolj specifične so restrikcijske endonukleaze oz. restriktaze pri bakterijah.

Endonukleaze prepoznajo specifično zaporedje nukleotidov in režejo obe verigi molekule DNA. Prepoznavna mesta navadno obsegajo 4–8 nukleotidov. Številna prepoznavna mesta so palindromska, kar pomeni, da se dušikove baze berejo enako v obe smeri. V teoriji obstajata dva tipa palindromskih sekvenc: ogledalu podoben (*angl.* mirror-like) in obratno ponovljen (*angl.* inverted repeat). Pogostejši so obratno ponovljeni palindromi, ki imajo pomembnejšo biološko vlogo.

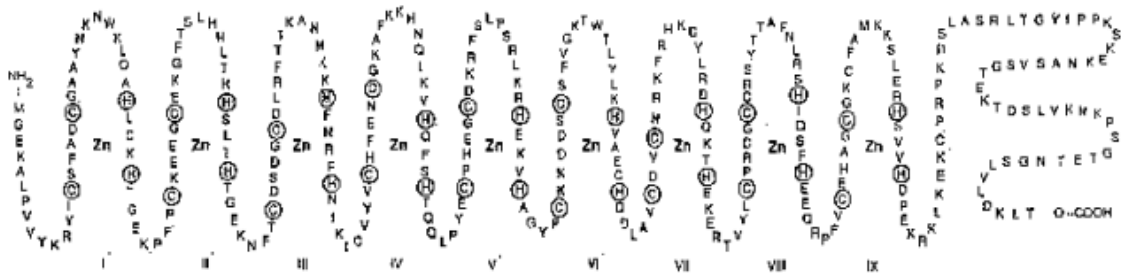
Endonukleaze razvrstimo v več osnovnih skupin (tip I, II, III, IV). Vse vrste encimov specifično prepoznajo kratko sekvenco DNA in jo razcepijo, da nastanejo dvoverižni fragmenti DNA s terminalnim 5'-fosfatom. Posamezne skupine se razlikujejo v zgradbi, potrebi po encimskem kofaktorju, po naravi sekvence, ki jo prepoznajo, ter po poziciji razcepitvenega mesta glede na mesto prepoznavne v molekuli DNA.

- a) Endonukleaze tipa I cepijo DNA na predelu, ki je oddaljen od prepoznavnega mesta, in za delovanje potrebujejo molekule ATP in encimski kofaktor S-adenozil-L-metionin. V skupino spada tudi endonukleaza CEL-I (pomemben člen pri zaznavanju mutacij z nukleaznim testom Cel-I), ki je sposobna rezati DNA na mestu zamenjave enega nukleotida (Yang B. in sod., 2000).

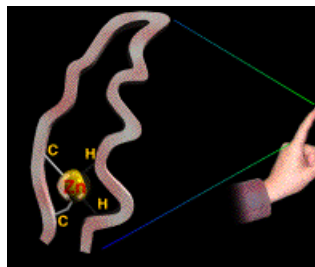
- b) Endonukleaze tipa II so dimeri, sestavljeni le iz ene podenote. Prepoznavna mesta so po navadi nedeljena in palindromska, sestavljena iz 4–8 nukleotidov. Imajo le restriksijsko funkcijo in molekulo DNA razcepijo na istem mestu, kot jo prepoznajo. Za delovanje ne potrebujejo ATP-molekul, potrebujejo pa magnezijeve ione v vlogi kofaktorjev. Ločimo več podskupin. V to skupino uvrščamo tudi nukleazo *FokI*, ki je katalitični del nukleaz z motivi cinkovih prstov.
- c) Endonukleaze tipa III cepijo na mestih, ki so blizu prepoznavnega mesta. Za delovanje potrebujejo molekule ATP in kofaktor S-adenozil-L-metionin.
- d) Encimi tipa IV učinkujejo na metilirano DNA in so najmanj razširjeni v molekularnih metodah (Pingoud A. in sod., 1993; Yang B. in sod., 2000).

1.1.3.2.2 Cinkovi prsti

Cinkove prste so prvič odkrili v proteinu *TFIIIA* žabe *Xenopus laevis* (slika 2). Protein je sestavljen iz niza podobnih enot, ki jih zaradi oblike imenujemo prst (slika 3).



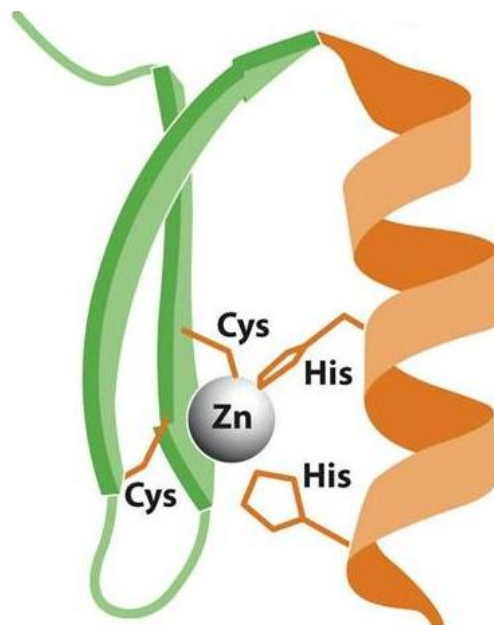
Slika 2: Aminokislinsko zaporedje TFIIIA z devetimi cinkovimi prsti (Rhodes in Klug, 1993)



Slika 3: Cinkov prst (Rhodes in Klug, 1993)

Vsaka enota je zgrajena iz 30 aminokislin, ki se zaradi parov aminokislin cisteina in histidina zvijejo v β -strukturo, ta pa je s fleksibilnim linkerjem vezana na α -vijačnico. Terciarno strukturo stabilizira cinkov ion (slika 4). V linearni predstavitvi so hidrofobne aminokisliline znotraj cinkovih prstov relativno daleč narazen, v 3D-prostoru pa lahko interagirajo in sodelujejo pri zvijanju podstruktur cinkovega prsta. Pri zvitju so hidrofobne aminokisliline blizu skupaj in tako oblikujejo hidrofobno jedro, kar cinkovemu prstu omogoča strukturo.

Različne kombinacije zaporedja cinkovih prstov omogočajo specifičnost vezave na vijačnico DNA tako, da se z α -vijačnico vstavi v velik jarek dvojne vijačnice (Rhodes in Klug, 1993).

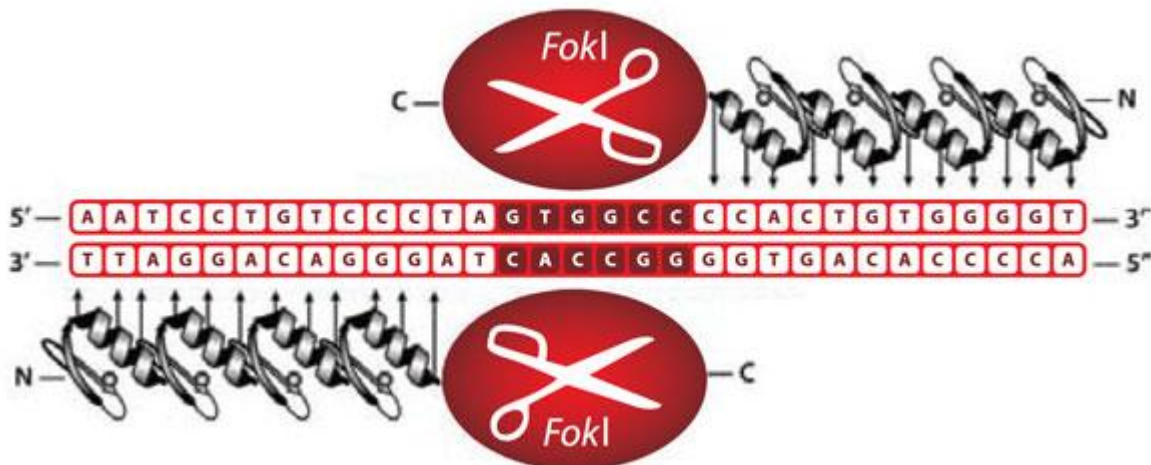


Slika 4: Shematski prikaz strukture cinkovega prsta (Garland science, 2012)

Dve aminokislilini cisteina (cys) na dnu β -struktur – zeleno in dve aminokislilini histidina (his) na dnu α -vijačnice – oranžno povezuje atom cinka in omogoča terciarno strukturo.

1.1.3.2.3 Princip delovanja nukleaz z motivi cinkovih prstov

Genski konstrukt za prepis v nukleaze z motivi cinkovih prstov v celice vnesemo v obliki plazmidne DNA ali kot transkript mRNA. Po translaciji v aktivne proteine se proteinski konstrukt translocira v jedro, v katerem se specifično vežejo na dvojno vijačnico. Nukleaze z motivi cinkovih prstov so zgrajene iz dveh monomernih proteinov, ki prepoznata specifično zaporedje na tarčni DNA – slika 5. Vsak monomer je zgrajen iz dveh domen, in sicer iz specifične DNA N-terminalne vezavne domene, ki je prek variabilnega peptidnega linkerja povezana z nespecifično nukleazno domeno (Porteus in Carroll, 2005). Vezavni domeni okleneta dvojno vijačnico na razdalji 4–7 baznih parov, kar predstavlja prostor za nastanek katalitično-aktivnega dimera, ki povzroči prekinitev dvojne vijačnice (*angl.* DSB – double strand break). Specifičnost vezave se zaradi dimerizacije podvoji na 24–36 baznih parov dolgo zaporedje, saj vsaka specifična DNA N-terminalna vezavna domena prepozna specifično zaporedje od 12 do 18 nukleotidov.



Slika 5: Shematski prikaz dimerjev nukleaz z motivi cinkovih prstov (Biowire, 2010)

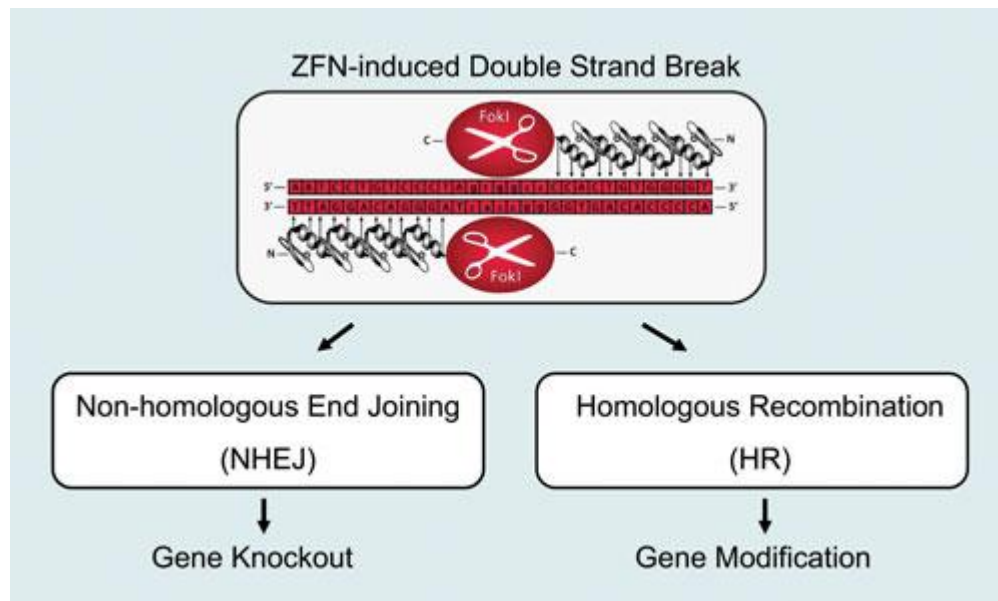
Specifična DNA N-terminalna vezavna domena ali cinkovi prsti in nespecifična nukleazna domena (*FokI*).

Uspešnost rezanja kompleksa ZFN je odvisna od dostopnosti vijačnice DNA. Vezavo lahko onemogočajo ali ovirajo metilacija DNA, pakiranje DNA s histoni ali prisotnost nekaterih drugih proteinov na mestu vezave (Hoshaw in sod., 2010). Učinkovitost je odvisna tudi od koncentracije plazmidne DNA, ki jo vnesemo v celico. Visoka koncentracija pDNA povzroča toksične učinke, nizka pa ne omogoča izražanja zadostne količine ZFN, saj je proteinski kompleks ZFN stabilen le nekaj ur (Suresh R. in sod., 2013). Prekinitiv dvojne vijačnice aktivira endogene popravljalne mehanizme. Poznamo dva glavna mehanizma – nehomologno združevanje koncev (*angl.* non-homologous end joining – NHEJ) in homologno rekombinacijo (*angl.* homologous recombination – HR). Kateri izmed mehanizmov se bo aktiviral, je odvisno od tega, v kateri fazi celičnega cikla je celica. Mehanizem nehomolognega združevanja koncev postane aktiven ob vstopu v fazo G1/G0 in se ob vstopu v fazo S inaktivira. Heterodimer »Ku« deluje kot sprožilec, njegovi podenoti »Ku70« in »Ku80« pa sta namenjeni prepoznavanju dvojnih prelomov molekule DNA. Na polovici in koncu faze S celičnega cikla in ob prehodu G2 v fazo M celičnega cikla popravljalni mehanizem predstavlja homologna rekombinacija. Aktivator popravljalnega mehanizma so proteini Mre11, Rad50, NBN in skupaj tvorijo kompleks »MRN« (Minafra in Bravata, 2014).

Ker popravljalni mehanizmi vseh dvojnih prelomov ne popravijo pravilno, nastanejo mutacije v nukleotidnem zaporedju gena. Ob prekinitvi dvojne vijačnice z nukleazo nastaneta lepljiva prosta konca. Pri nehomolognem združevanju koncev povzroči integracijo ali delecijo nekaj baznih parov na obeh koncih preloma. Sprememba nekaj baznih parov znotraj bralnega okvirja privede do sprememb kodirajočega zaporedja in morebitne disfunkcije proteina. Ali je popravljalni mehanizem sposoben takšno mutacijo popraviti, je odvisno od obsega in mesta poškodbe.

Ob popravilu s homologno rekombinacijo se ob prekinitvi dvojne vijačnice lahko vstavijo ali zamenjajo tedaj prisotna homologna zaporedja v obliki plazmidne DNA. Popravljalni mehanizem lahko napako popravi s pomočjo homolognega zaporedja sestrške kromatide. Pogoj homologne rekombinacije je ujemanje 3'- in 5'-koncev homolognega zaporedja s prostima koncema razpoke dvojne vijačnice. Integracija ali zamenjava genskega konstrukta se

uporablja pri razvoju novih celičnih linij oz. pri zamenjavi okvarjenih genov (Guo in sod., 2010).



Slika 6: Popravljalni mehanizmi; HR – homologna rekombinacija, NHEJ – nehomologno združevanje koncev (Biowire, 2010)

Uporaba ZFN je robustna in učinkovita metoda, saj je posledica trajna okvara ciljnega gena, katere zahteva je le prehodno izražanje ZFN. Ker gre za spremembo na genetski ravni, se ta stabilno prenaša na naslednje generacije, kot pri klasičnem pristopu homologne rekombinacije, ki je bila v preteklosti večkrat uspešno uporabljena pri poskusih popolnega izbitja gena za prionski protein. Več skupin je namreč razvilo miši z okvarjenim genom za PRNP (Bueler in sod., 1992; Prusiner in sod., 1993; Sailer in sod., 1994).

1.1.4 Plazmidni vektorji

Plazmidni vektorji so majhne (okoli 4000 do 5000 baznih parov), zunajkromosomske, krožne dvovertične molekule DNA. Pri bakterijah se podvajajo neodvisno od genomske DNA, v primeru sesalskih celic pa se vgradijo v genom (Watson, 2007).

Sestavne komponente vektorja so: mesto za neodvisen začetek pomnoževanja (*angl.* Origin of replication – ORI), rekombinantni/tarčni gen s promotorjem, selekcijski označevalec (gen za odpornost proti antibiotikom, ki omogočajo selekcijo v rastnih medijih).



Slika 7: Shematski prikaz vektorja (avtorska shema)

V vektor je vstavljen promotor, ki omogoča visoko raven izražanja ciljnega gena. Med množico dostopnih promotorjev se najpogosteje uporabljajo zgodnji promotor virusa SV40, promotor dolge terminalne ponovitve virusa RS (*Raus sarkoma*) in zgodnji promotor človeškega citamegalovirusa (*CMV*). ORI-mesto pomeni mesto začetka podvojevanja in je nujno potrebno, saj omogoča začetek replikacije. Plazmid mora vsebovati tudi selekcijski označevalec za selekcijo transformiranih celic. Ciljni gen in selekcijski označevalec imata lahko ločena promotorja ali spadata pod istega. Med antibiotičnimi selekcijskimi označevalci je najpogostejši gen *ntp* za odpornost proti geneticinu. Zaradi slabosti antibiotičnih selekcijskih označevalcev (pridobljena odpornost, variabilne selektivne koncentracije itd.) se čedalje bolj uveljavljajo avksotrofni selekcijski označevalci, ki omogočajo celicam preživetje v rastnih medijih brez esencialnih komponent (Cheryl in sod., 2009).

Plazmidni vektorji vsebujejo tudi mesto MSC ali polilinker (*angl.* multiple cloning site – MSC; polylinker). Je območje, bogato s prepoznavnimi mesti za restrikcijske encime, kamor se integrira ciljni gen. Mesto MSC omogoča izbiro naprimernejšega restrikcijskega encima glede na zaporedje ciljnega gena in mesta integracije na vektorju, saj imajo fragmenti DNA,

razrezani z isto restriktivno endonukleazo, komplementarne lepljive konce (Kroll in sod., 2010).

V parentalne celice CHO lahko s postopkom transfekcije vnesemo zapis za nukleazo z motivi cinkovih prstov na plazmidnem vektorju. Pred vnosom lahko plazmid lineariziramo, kar omogoči lažji prenos skozi membrano in integracijo v genom gostiteljske celice.

Poznamo več načinov vnosa plazmidnega vektorja v gostiteljske celice:

1. Transfekcija: celice v kulturi spontano inkorporirajo fragmente DNA z zelo nizko frekvenco. To frekvenco lahko povečamo s:
 - fragmentiranjem prečiščene DNA na odseke, dolge 30 – 50.000 baznih parov v raztopini fosfatnega pufru,
 - raztopino precipitiramo s kalcijevim kloridom,
 - na celico apliciramo močno električno polje, ki spremeni prepustnost membrane (elektroporacija).
2. Mikroinjekcija: pomeni neposreden vnos eksogene DNA v celični nukleus, njena pomanjkljivost je, da se tretira vsaka celica posebej, zato je zelo počasna in zamudna.
3. Infekcija celice z inaktiviranim retrovirusom: je virus, v katerem nadomestimo virusne z našimi geni. Tehnika je lahko nevarna zaradi naključne integracije v celični genom (Andreason And Evans, 1988; Chu et al., 1987).

1.1.5 Nukleazni test Cel-I (Surveyor mutation detection kit, Transgenomic)

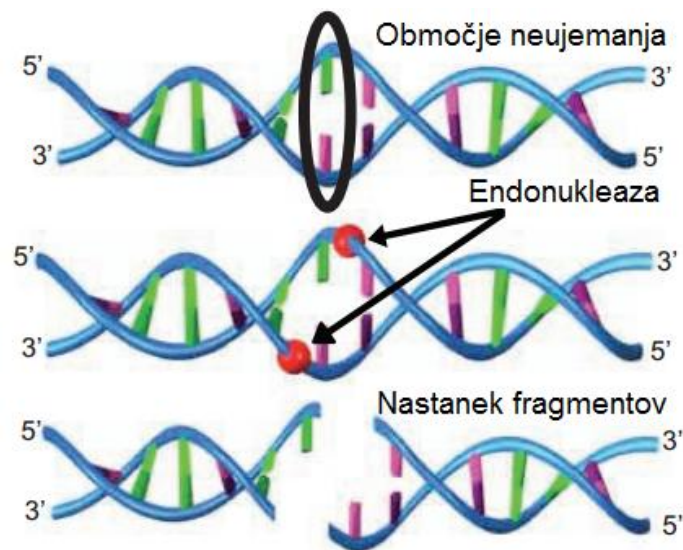
Tehnologija temelji na endonukleazi, ki zazna mestno specifična neujemanja DNA. Surveyor endonukleaza spada v podskupino CEL in je tip endonukleaz I. Cepi na koncu 3' neujemanja zaporedja obe verigi dvojne vijačnice (Peter in sod., 2004). S testom lahko poiščemo znane in neznane mutacije ter polimorfizme na molekuli DNA.

Test obsega naslednje korake:

1. namnoževanje specifičnega nukleotidnega zaporedja z metodo PCR,

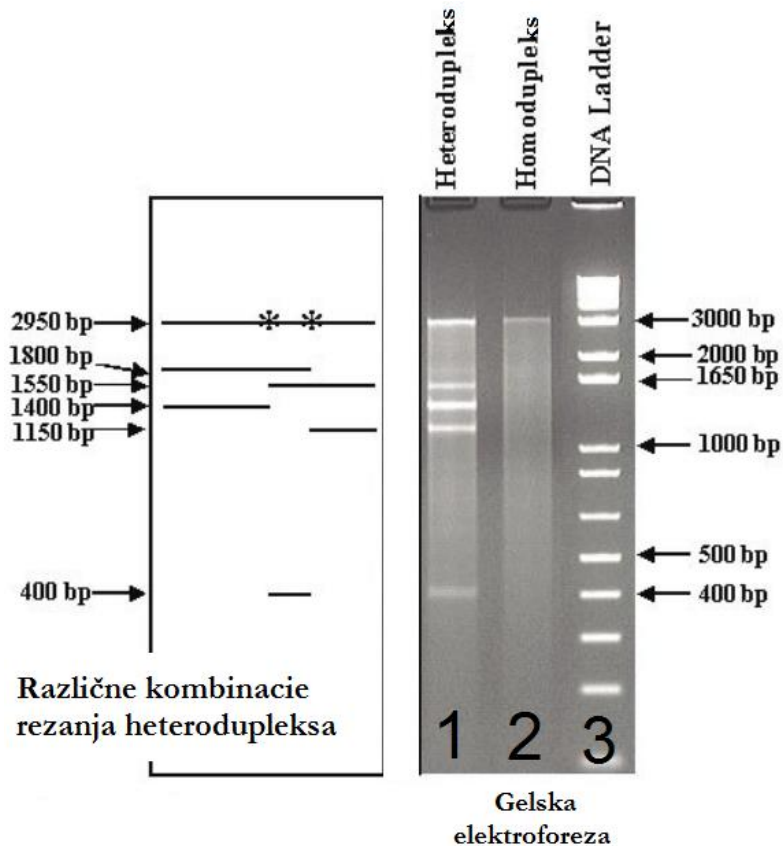
2. hibridizacijo – nastanek heterodupleksov/homodupleksov,
3. obdelavo z endonukleazo Cel-I,
4. analizo fragmentov na gelski elektroforezi.

Gen z domnevno mutacijo namnožimo s PCR. Nastale produkte PCR nato hibridiziramo, pri čemer lahko nastanejo hetero- in homodupleksi. Heterodupleks je dvojna vijačnica nukleinskih kislin, pri čemer se verigi ne ujemata v nekaj nukleotidih in nastane v primeru prisotne mutacije na nukleotidnem zaporedju. Pri homodupleksih sta verigi povsem komplementarni. Obliki nastaneta med hibridizacijo produkta PCR, ki pomeni prilaganje dveh komplementarnih verig DNA (John H. A. in sod, 1969). Če se verigi razlikujeta v nekaj nukleotidih, nastane deformacija (veriga se uviha). Hibridizirani produkt PCR nato tretiramo z visoko specifično endonukleazo Cel-I, ki vijačnico DNA cepi na mestu neujemanja verig.



Slika 8: Delovanje endonukleaze Cel-I (povzeto po www.transgenomic.com, april 2013)

Prepoznane so insercije, delecije in zamenjave baz v baznem paru – točkovne mutacije. Po tretiranju z endonukleazo Cel-I različne velikosti fragmentov preverimo na agarozni ali poliakrilamidni elektroforezi, pri čemer v primeru delovanja nukleaze zaznamo fragmente različnih velikosti.



Slika 9: Analiza fragmentov na agaroznem gelu po obdelavi s Cel-I (povzeto po www.transgenomic.com, april 2013)

S slike 9 je razvidna primerjava vzorca z mutacijami na stezi 1, z vzorcem brez mutacij na stezi 2 elektroforeznega gela. Če fragment ne vsebuje mutacij, se po hibridizaciji produkta PCR (v tem primeru 2950 bp) tvorijo homodupleksi zaradi popolne komplementarnosti verig, ki jih endonukleaza ne cepi, in ni vidnih dodatnih fragmentov (slika 9, steza 2).

Po hibridizaciji produkta PCR, ki vsebuje mutacije, se tvorijo različne kombinacije heterodupleksov. Nukleaza reže na vseh mestih neujemanja znotraj novonastalih heterodupleksov. Na elektroforeznem gelu (slika 9, steza 1) opazimo vse kombinacije tretiranega fragmenta (2950, 1800, 1550, 1400, 1150 in 400 bp) z nukleazo Surveyor. Poleg približnega mesta mutacije na produktu PCR glede na število fragmentov ugotovimo tudi število mutacij.

S standardom velikosti DNA (slika 9, steza 3) določimo velikosti fragmentov (Peter in sod., 2004).

1.1.6 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za encimsko pomnoževanje specifičnih sekvenc DNA *in vitro*.

PCR je sestavljen iz ponavljajočih se faz, z določenimi temperaturami.

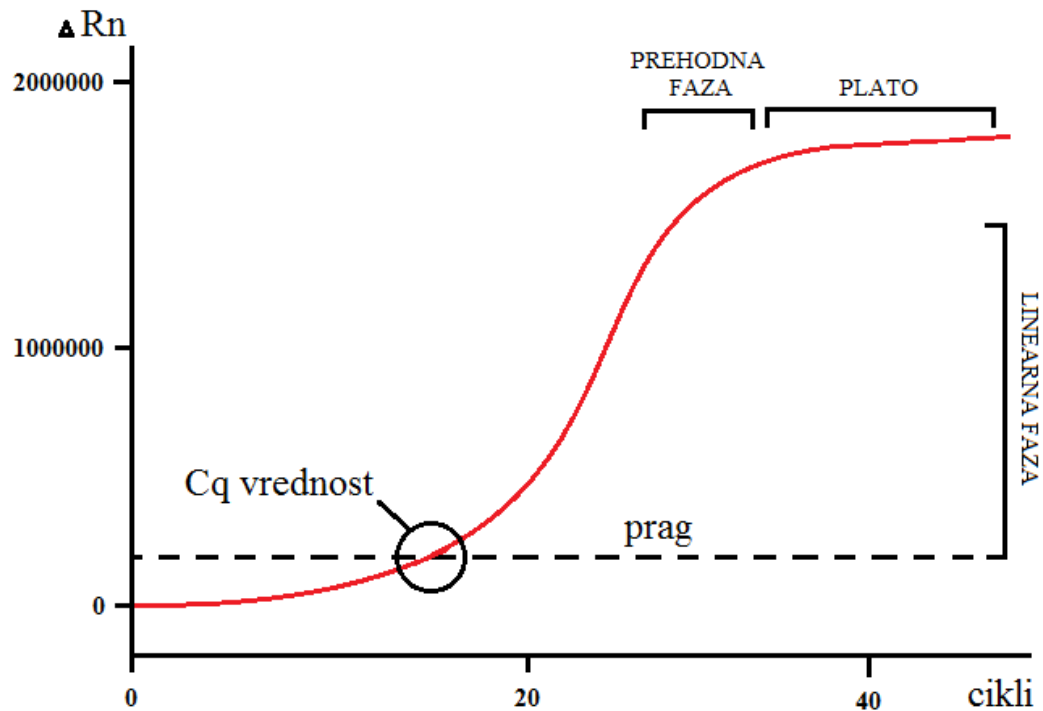
- a) 1. faza: denaturacija dvoverižne matrične DNA v enoverižno DNA pri 94–95 °C;
- b) 2. faza: prileganje oligonukleotidnih začetnikov na homologne sekvence pri 37–70 °C;
- c) 3. faza: polimeriacija nove verige DNA iz nukleotidov s pomočjo termostabilne DNA polimeraze pri 60–72 °C.

Za pomnoževanje tarčne sekvence DNA se uporabljata dva oligonukleotidna začetnika. Prvi je homogen sekvenci smiselne verige DNA, drugi pa sekvenci protismiselne (komplementarne) verige in je lociran na primerni razdalji, od 70–3000 bp. Z uporabo takih oligonukleotidnih začetnikov nastaneta v prvem ciklu PCR dve vrsti novih DNA-verig, ki se začeta z enim ali drugim oligonukleotidnim začetnikom in nadaljujeta z nekaj sto do nekaj tisoč bp dolgih verig (Applied Biosystems, 2004). V drugem ciklu se oligonukleotidna začetnika vežeta na originalno molekulo DNA in na nov, krajši pomnožek, ki je nastal v prvem ciklu. Ko so kot tarčne molekule za pomnoževanje uporabljeni novi deli DNA, se polimerizacija konča hitreje in pomnožki se začnejo s sekvenco enega oligonukleotidnega začetnika in končajo homologno sekvenco drugega začetnika (Kuchta, 2006). Pomnožki se lahko preprosto določajo z agarozno elektroforezo v prisotnosti standarda različnih velikosti. PCR uporabljamo za hitro (15 min–2 h), občutljivo (meja zaznave je ≥ 10 molekul izhodnega materiala v reakciji PCR) in visoko selektivno pomnoževanje specifičnih zaporedij DNA, ki jih je mogoče določiti tudi, če so v istem vzorcu prisotne večje količine drugih molekul DNA.

1.1.7 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

PCR v realnem času (real-time PCR) temelji na merjenju fluorescence pomnožkov med procesom pomnoževanja (Kuchta, 2006). Spremljanje nastajanja pomnožkov s PCR v realnem času je mogoče z označevanjem sond z molekulami, ki fluorescirajo. Te molekule, zaradi pomnoževanja tarčne DNA, povzročijo spremembo signala, ki je odvisen od količine pomnožka med vsakim ciklom in se poveča, če se poveča količina specifičnega pomnožka (Mackay I. M., 2004). Fluorescenco merimo ves čas poteka reakcije, zato lahko izrišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov.

Krivulja pomnoževanja na sliki 10 je grafični prikaz fluorescentnega signala v odvisnosti od števila ciklov PCR. Osnovna linija prikazuje začetne cikle, pri katerih se fluorescentni signal skoraj ne spreminja. Ko je pomnožka dovolj, začne krivulja rasti eksponentno (linearna faza). V idealnih razmerah se količina pomnožka povečuje za $1 \log_{10}$ vsakih 3,32 cikla. Ko se količina oligonukleotidnih začetnikov in encima začne zmanjševati in ko začne količina produkta PCR postajati inhibitorna, se reakcija upočasni, nastopi prehodna faza in nato plato, pri čemer se fluorescenca ne povečuje več (Applied Biosystems, 2004).



Slika 10: Krivulja emisije fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (povzeto po <http://www.appliedbiosystems.com>, 2004).

Točka, pri kateri se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja, je cikel meje zaznavanja in jo imenujemo vrednost C_q oziroma presečišče C_p (C_p – *angl.* crossing point) (Mackay I. M., 2004). Meja zaznavanja je linija, ki seka krivuljo fluorescence na točki C_q (Applied Biosystems, 2004).

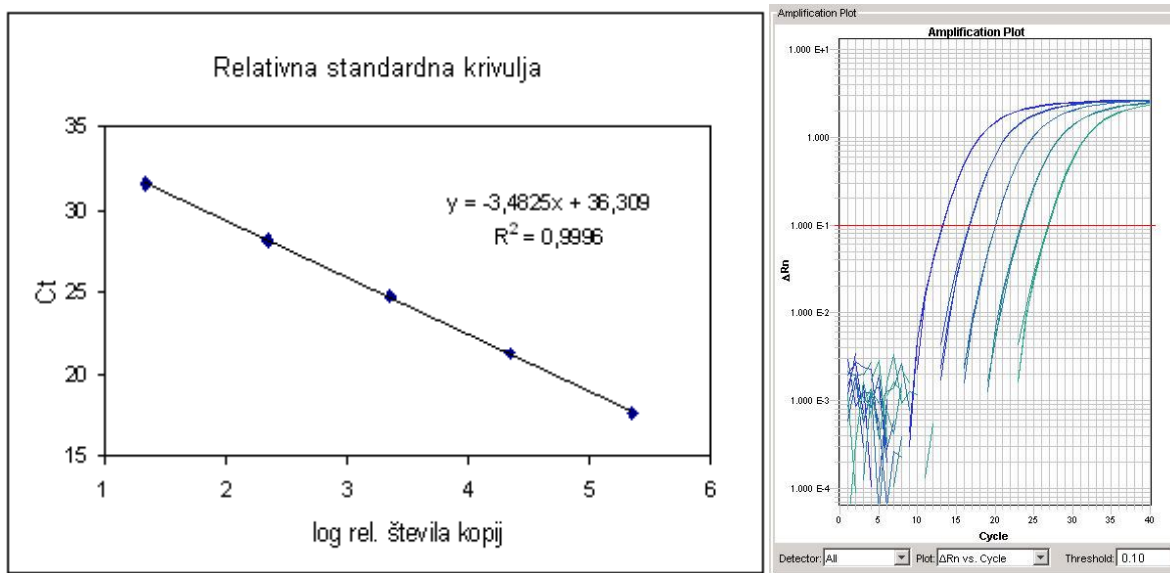
Za qPCR-analizo moramo poznati naslednje pojme (Wong in sod., 2005; Valasek in Repa, 2005; Heid in sod., 1996):

- **Bazna linija:** raven fluorescence, ki ponazarja intenziteto signala, dokler se ta ne dvigne nad ozadje.
- **ΔRn :** Rn je normaliziran reporterski signal in pomeni razmerje med signalom reporterskega barvila in pasivne reference. Z njo korigiramo nihanje fluorescentnega signala, ki ne izvira iz reakcije, ampak iz fluorescence ozadja (komponente reakcije,

plastika, prašni delci). Najpogosteje se uporablja barvilo ROX in je v večini primerov že sestavna komponenta komercialno dostopnih reakcijskih mešanic. ΔR_n je razlika med emisijo fluorescence produkta (R_n) in signalom bazne linije. R_n in ΔR_n se povečujeta med reakcijo, dokler ta ne doseže platoja faze.

- **Pražna vrednost:** je vrednost fluorescence, pri kateri amplifikacijski signal preseže signal ozadja. Nastavljena mora biti na eksponentnem delu krivulje.
- **Cq-vrednost:** je cikel, v katerem fluorescenca nakopičenega PCR-produkta preseže linijo pražne vrednosti. Na podlagi Cq-vrednosti primerjamo vzorce med seboj in jih uporabimo za nadaljnje računanje (absolutna in relativna kvantifikacija). Cq-vrednost je obratnosorazmerna z začetnim številom kopij matrice. Več kopij tarčnega nukleotidnega zaporedja v vzorcu pomeni nižji cikel, pri katerem fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja.
- **Standardna krivulja:** podana je kot logaritemska vrednost števila kopij ali koncentracije tarčnega nukleotidnega zaporedja v odvisnosti od Cq. Pripravimo jo z redčitveno vrsto znanih koncentracij standarda.
- Iz **naklona krivulje** lahko določimo učinkovitost pomnoževanja (pri naklonu $-3,32$ je učinkovitost pomnoževanja 100 %).
- **Korelacijski koeficient (R^2)** nam pove, kako dobro se meritve prilegajo idealni krivulji (maksimalna vrednost je 1), ki je v tem primeru premica.
- **Y-presek** je točka, v kateri standardna krivulja seka os y. Kaže teoretično mejo zaznave. Teoretično lahko s to metodo zaznamo tudi le eno kopijo tarčnega nukleotidnega zaporedja, v praksi pa je najnižja vrednost, ki jo zanesljivo določimo, 5 kopij.
- **Relativna standardna krivulja:** enako kot standardna krivulja, le da nimamo standarda z znanimi koncentracijami, ampak vzorec redčimo in upoštevamo relativne redčitve med

njimi. Ta krivulja (slika 11) je pomembna za določitev učinkovitosti pomnoževanja v vzorcu.



Slika 11: Relativna standardna krivulja real time PCR (<http://www.appliedbiosystems.com>, 2004)

Relativna standardna krivulja z enačbo premice in (desno) amplifikacijske krivulje posameznih točk standardne krivulje.

$$\text{Enačba: } y = kx + n \quad \dots (1)$$

Legenda: k = naklon premice, n = presek na y osi.

Na učinkovitost PCR v realnem času vplivajo številni dejavniki, kot so inhibitorji in spodbujevalci encimske reakcije, degradacija DNA, degradacija vzorca, nespecifični pomnožki, dolžina pomnožka, sekundarna struktura pomnožka, vrsta in čistost oligonukleotidnih začetnikov (in sonde), koncentracija DNA, sestavine reakcijske mešanice, razmere pomnoževanja, fluorogena barvila, laboratorijska praksa, vrsta in značilnosti aparata za PCR (Pfaffl, 2004; Dorak, 2006).

1.1.7.1 Nespecifične metode določanja pomnožkov

Metoda temelji na uporabi fluorescentnega barvila SYBRGreen, ki se med pomnoževanjem nespecifično vgradi v dvovertično molekulo DNA. Ker se SYBRGreen veže v vse dvovertične

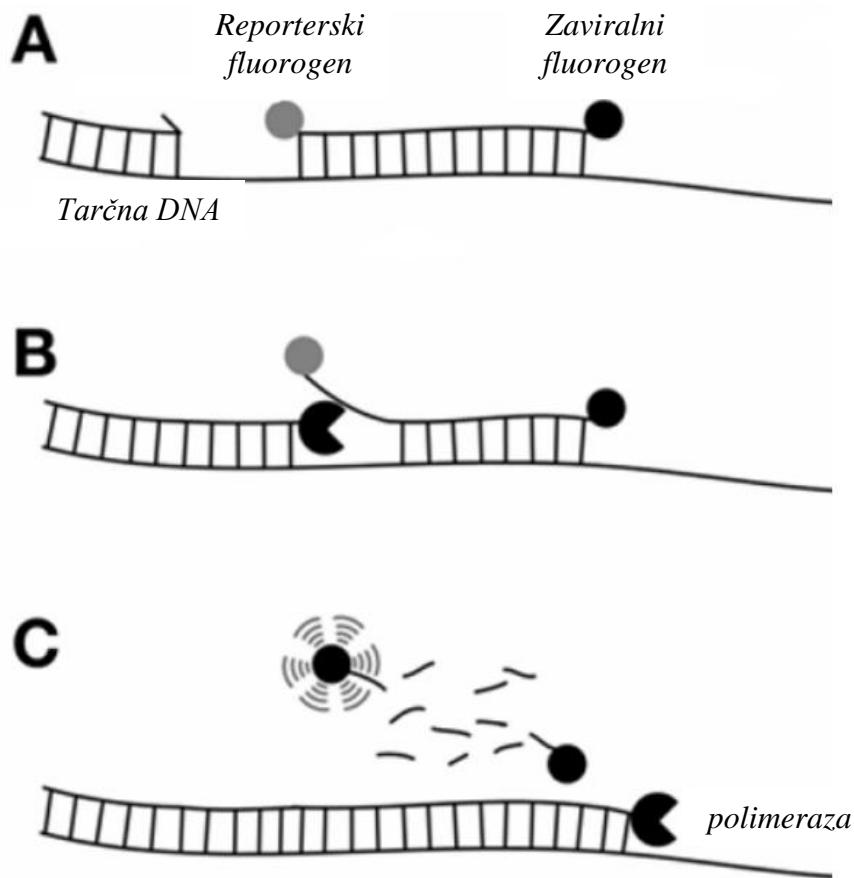
molekule DNA, je rezultat povečanje intezitete fluorescence proporcionalno s količino novonastalega dvoverižnega produkta PCR (Applied Biosystems, 2004).

1.1.7.2 Specifične metode določanja pomnožkov

Pri specifičnem določanju pomnožkov metoda uporablja tako imenovano TaqMan-sondo, ki temelji na tehnologiji FRET (fluorescence resonance energy transfer). To je spektroskopski proces, pri katerem se prenaša energija med molekulami, ki so oddaljene za 10–100 Å in imajo prekrivajoče se emisijske in adsorpcijske spektre. Prenos energije poteka od zaviralnega k reporterskemu fluorogenu, ki oddaja energijo pogosteje v obliki toplote kot fluorescence (Mackay I. M., 2004). Kot pri nespecifičnih metodah je tudi pri specifični koncentracija fluorescentnega barvila proporcionalna količini pomnožka. Uporaba sond, označenih z različnimi fluorescentnimi barvili, omogoča sočasno spremljanje več različnih specifičnih fragmentov DNA hkrati (Kuchta, 2006).

Pri TaqMan-sondah je reporterski fluorogen navadno FAM (6-karboksi fluorecin), ki je na 5'-koncu sonde, na 3'-koncu pa je vezan zaviralni fluorogen, največkrat TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin), slika 11A, (Kuchta, 2006; Mackay I. M., 2004). Oligonukleotidne sonde so narejene tako, da imajo temperaturo taljenja nekoliko višjo od temperature taljenja oligonukleotidnih začetnikov in se zato vežejo na tarčno DNA pred njimi (Kuchta, 2006).

Sonda v intaktnem stanju ne fluorescira. Med prileganjem oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanjem verige DNA (slika 12 A, B) DNA-polimeraza odcepi zaviralni fluorogen od reporterskega, ki začne fluorescirati (slika 12 C), (Mackay J. in Landt, 2007).



Slika 12: Hidroliza TaqMan-sonde (povzeto po <http://www.appliedbiosystems.com>, junij 2012)

A: prileganje oligonukleotidnih začetnikov; B: podaljševanje verige DNA; C: hidroliza sonde.

1.1.7.3 Začetni oligonukleotidi in sonde

Začetne oligonukleotide za PCR in qPCR lahko načrtujemo z uporabo temu namenjenih programov (npr. *Primer Express*) ali pa s servisom, ki ga ponujajo različni proizvajalci začetnih oligonukleotidov (npr. *Assay by Design* podjetja *Applied Biosystems*). Začetni oligonukleotidi za qPCR morajo zadostiti nasljenemu (Nolan in sod., 2006):

- ampliconi morajo biti kratki (50 do 150 bp),
- dolžina začetnih oligonukleotidov 15–25 nukleotidov,

- T_m obeh oligonukleotidov naj bo čim bolj podobna,
- oligonukleotid naj nima regij z več kot 70 % homologijo z matrično DNA zunaj koncev, med katerimi pomnožujemo,
- manj kot 50 % vsebnost GC,
- izogibamo se načrtovanju začetnih oligonukleotidov z možnostjo tvorbe sekundarnih struktur (obrnjena zaporedja) ali oligonukleotidnih dimerov (komplementarnost zaporedij na 3'-koncu),
- izogibamo se začetnim oligonukleotidom z enim ali dvema G/C na 3'-koncu in več kot trikratni ponovitvi iste baze.

1.1.7.4 Kvantifikacija

Kvantifikacija je lahko relativna ali absolutna. Pri relativni določamo spremembe v količini tarčne DNA tako, da primerjamo signal tarčne sekvence s signalom referenčne sekvence. Uporablja se predvsem za ugotavljanje sprememb izražanja terčnega gena na podlagi relativne primerjave z referenčnim genom v vzorcu. Absolutna kvantifikacija pa omogoča določitev točnega števila tarčne DNA v vzorcu.

Zanesljivost kvantifikacije je pogojena s pravilno izbiro in dobro kakovostjo kontrol. Pozitivna kontrola omogoča kontrolo poteka PCR. Ta se uporablja za določevanje lažno negativnih rezultatov in ugotavljanje sposobnosti podvojevanja DNA.

Pri metodi z razredčevanjem uporabimo kot vzorce 10 x razredčitve osnovnega vzorca in rezultate PCR v realnem času ovrednotimo z izračunom premice, kot odvisnosti vrednosti C_q od koncentracije vzorca DNA (Applied Biosystems, 2004).

1.2 NAMEN DELA

Namen je generirati populacijo klonov z uspešno izbitim ciljnim genom, ki ga zaradi tehnološko-komercialnih razlogov ne smemo razkriti. Plazmidno DNA z zapisom za nukleazo z motivi cinkovih prstov bi po linearizaciji transficirali v dva derivata celic CHO (CHO *Der2* in CHO *Der3*), nato pa bi preverili uspešnost delovanja ZFN na ravni mešane populacije z

metodo nukleaznega testa Cel-I. Mešani populaciji vsake celične linije bi nato klonirali in iz posameznih klonov izolirali genomsko DNA. Z metodo nukleaznega testa Cel-I bi na ravni klonov preverili nastanek mutacij, z metodo qPCR pa ocenili število kopij ciljnega gena v primerjavi s starševsko celično linijo. Hoteli smo tudi preveriti uporabo metode qPCR za identifikacijo klonov, pri katerih je prišlo do izbivanja gena, saj je uporaba nukleaznega testa Cel-I, ki se navadno uporablja v ta namen, dolgotrajna in zahteva veliko laboratorijskega dela. Na podlagi pridobljenih rezultatov bi ovrednotili uspešnost izbivanja ciljnega gena s tehnologijo nukleaz z motivi cinkovih prstov.

1.3 HIPOTEZE

- 1) S tehnologijo nukleaz z motivi cinkovih prstov želimo izbiti ciljni gen pri vsaj 1 % klonov celičnih linij CHO *Der2* in CHO *Der3*.
- 2) Delovanje nukleaz z motivi cinkovih prstov bo učinkovitejše pri celični liniji CHO *Der2* kot pri CHO *Der3*. Celična linija CHO *Der2* je diploid, CHO *Der3* je triploid.
- 3) Z metodama nukleaznega testa Cel-I in qPCR bomo identificirali klone, pri katerih je nastal rez po delovanju nukleaze z motivi cinkovih prstov, ter ovrednotili uspešnost izbivanja ciljnega gena.
- 4) Po generiranju populacije klonov bomo z metodo qPCR vzpostavili hiter in natančen način vrednotenja izbivanja ciljnega gena na posameznem klonu.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 MATERIAL

Izbrana modela za proučevanje vrednotenja izbivanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov sta bila derivata celične linije kitajskega hrčka (CHO) z oznakami CHO *Der2* in CHO *Der3*. Celični liniji uporabljamo za razvoj biološkim podobnih zdravil v enoti Biofarmacevtike podjetja Lek, d. d.

Celični liniji rasteta v rastnem mediju, sestavljenem iz osnovnega medija, obogatenem z dodatki (L-glutamin, inzulin ...). Osnovni medij ne vsebuje komponent živalskega izvora. Celice v gojišču rastejo v suspenzijski kulturi.

Celice smo gojili v rastnih platenkah (erlenmajericah) z volumni 125 ml. Rastne platenke smo gojili v stresalniku Kuhner pri nadzorovani atmosferi s temperaturo 37 °C, 10 % CO₂ in stresanjem pri 110 rpm. Po kloniranju smo namnoževanje posameznih klonov izvajali v gojitvenih mikrotitrskih ploščicah s 96, 24 in 6 vdolbinicami.

Preglednica 1: Kemikalije, uporabljene pri delu

Kemikalija	Proizvajalec	Namen uporabe
nukleofekcijski kit	Lonza	nukleofekcija celic
vektor kit, CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases, SAFCZFN-1kt, c= 0,3µg/ml	Sigma	plazmidni vektor z zapisom nukleaze z motivi cinkovih prstov
encim <i>SwaI</i> (10000 enot/ml) + 10 x reakcijski pufer	New England Biolabs	linearizacija vektorja
voda prosta nukleaz (<i>anlg.</i> Nuclease-free water)	Ambion	raztapljanje DNA, mešanice za elektroforezo
izopropanol	Merck	postopek linearizacije
70 % etanol	Merck	postopek linearizacije
GFP-vektor	Lonza	pozitivna kontrola pri nukleofekcijah

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Kemikalije, uporabljene pri delu

CloneMatrix	Genetix	priprava poltrdnega rastnega medija pri kloniranju
1 x PBS	GIBCO	pufer za spiranje celičnih peletov
QIAamp DNA blood mini kit	Qiagen	kit za izolacijo gDNA
96 % etanol	Merck	čiščenje gDNA na aparaturi QiaCube
RNaza A (100 mg/ml)	Qiagen	odstranjevanje RNA pri izolaciji gDNA
Pfu polimeraza turbo (2,5 U/ μ l)	Thermo Scientific	PCR-reakcije
10 x polimerazni pufer	Thermo Scientific	pufer za delovanje polimeraze
dNTP (10 μ M)	Thermo Scientific	nukleotidi
E-gel 0,8 % in 2 %, Sybr safe	Invitrogen	predpripravljen elektroforezni gel z barvilom s Sybr Safe
standard velikosti 100 bp	New England Biolabs	100 baznih parov, primerjalna lestvica na elektroforeznem gelu
6 x DNA Loading Dye	Invitrogen	pufer za barvanje molekul DNA
TaqMan master mix	Applied Biosystems	mešanica reagentov za na qPCR
sonda TaqMan	Geneart	sonda qPCR

Preglednica 2: Uporabljena laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec
pipetor Accu-Jet	Brand, Nemčija
stripete (5 ml, 10, ml, 25 ml in 50 ml)	Corning Costar, ZDA
pipete Eppendorf 0,5 – 1000 μ l	Eppendorf, Nemčija
nastavki za pipete s filtri	Eppendorf, Nemčija
Amaxa Nucleofector II; Nukleofektor	Lonza, Švica

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Uporabljena laboratorijska oprema

mikrobiološka komora, LFV	Iskra, Slovenija
inkubator CO ₂	Binder, Švica
stresalnik CO ₂	Kuhner, Švica
erlenmajerice oz. rastne platenke (125 ml)	Corning Costar, ZDA
VI-Cell XR; aparat za štetje celic	Becman Coulter, ZDA
filtrni sistemi za filtracijo rastnih medijev	Corning Costar, ZDA
plošče za gojenje celic s 96 vdolbinicami in ravnim dnom	Genetix, ZDA
plošče za gojenje celic s 24 in 6 vdolbinicami ter ravnim dnom	Corning Costar, ZDA
plošče za gojenje celic s 6 vdolbinicami, ravnim dnom in črnimi stenami	Genetix, ZDA
ClonePix FL; robot za kloniranje	Genetix, ZDA
clone select imager (CSI), naprava za slikanje in določanje konfluente v mikrotiterskih ploščicah	Genetix, ZDA
QiaCube; robot za izolacijo genomske DNA iz manjših vzorcev	Qiagen, ZDA
centrifuga 5415R, 5810R in Minispin	Eppendorf, Nemčija
nastavek e-gel; stojalo za e-gel	Invitrogen, ZDA
Mastercycler pro S; aparat za pomnoževanje PCR	Eppendorf, Nemčija
LAS4000; naprava za slikanje elektroforeznih gelov	Fujifilm, Japonska
NanoDrop 100; spektrofotometer	Thermo Scientific, ZDA
Thermomixer; ogrevalna plošča za odtaljevanje kriovial	Eppendorf, Nemčija
Vorteks; vibracijski mešalnik	Tehtnica, Slovenija
2,0 ml, 1,5 ml in 0,5 ml mikrocentrifugirke	Eppendorf, Nemčija
sterilni robotski pipetirni nastavki s filtri	Applied Biosystems, ZDA

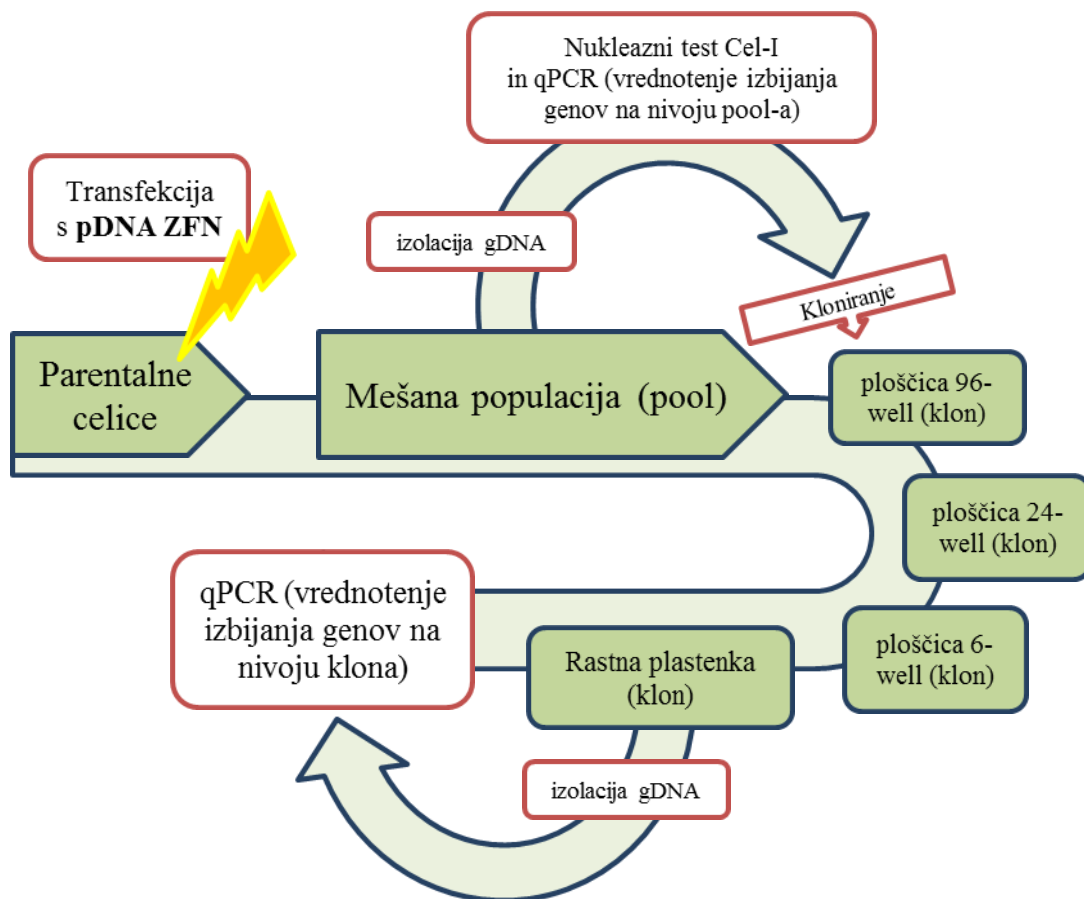
Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Uporabljena laboratorijska oprema

mikrotitrne ploščice s 96 in 384 vdolbinicami	Applied Biosystems, ZDA
optična folija za ploščice pred analizo	Applied Biosystems, ZDA
komora PCR	Applied Biosystems, ZDA
MixMate; mešalnik	Iskra, Slovenija
CAS-1200N; pipetirni sistem	Corbett, ZDA
ABI Prism®7900HT Sequence detection system	Applied Biosystems, ZDA

2.2 METODE

2.2.1 Načrt poskusov



Slika 13: Shema poskusa izbivanja gena z uporabo ZFN (avtorska shema)

Najprej smo z metodo nukleofekcije v parentalne celice vnesli plazmidno DNA z zapisom za ZFN. Nato smo izolirali gDNA ter uspešnost delovanja ZFN na ravni mešane populacije preverili z nukleaznim testom Cel-I in metodo PCR v realnem času. Mešano populacijo smo nato klonirali ter s postopnim gojenjem v ploščicah s 96, 24 in 6 vdolbincami vse do rastihi plastenki namnožili dovolj veliko količino celic za izolacijo gDNA. Uspešnost delovanja ZFN

smo nato preverili še na ravni klona in iz rezultatov ovrednotili uspešnost izbivanja ciljnega gena.

2.2.2 Odmrzovanje sesalskih celic

Vsebino kriovial smo odtalili na *Eppendorf Thermo Mixer* (400 rpm, 37 °C, 2–4 min). Nato smo vsebino krioviale s stripeto takoj prenesli v rastno platenko s pripravljenim rastnim medijem ter na aparaturi *Vi-cell XR* izmerili koncentracijo in delež živih celic. Suspenzijo celic smo uravnavali na končno koncentracijo $2 \cdot 10^5$ viabilnih celic/ml, za inkubacijo pa uporabljali stresalnik *Kuhner* pri 37 °C, 10 % CO₂, 110 rpm.

2.2.3 Vzorčenje suspenzije sesalskih celic na aparaturi Vi-cell XR

Vzorčenje smo opravljali tako, da smo celično kulturo aseptično prenesli iz rastne platenke v kiveto aparata *Vi-cell XR*. Aparat deluje na principu analize slik suspenzije sesalskih celic, ki jih zajame kamera v aparaturi. Cevka za vzorčenje opravi aspiracijo vzorca iz kivete v brizgo, v kateri se vzorcu doda barvilo *trypan blue*. Vzorec z barvilom prehaja skozi pretočno celico, v kateri kamera zajame večjo količino slik. Računalniški program analizira zajete slike, določa, katere celice so absorbirale *trypan blue* (mrtve celice) in katere ne (žive celice), jih prešteje in poda rezultat kot koncentracijo celic v suspenziji (št. celic/ml) in delež živih celic (%).

2.2.4 Kultivacija suspenzije sesalskih celic

Prenos celic v svež rasten medij smo opravljali z dvodnevni zamikom, namen pa je bil obdržati rast celične kulture v fazi eksponentne faze z velikim deležem živih celic. Na podlagi rezultatov o gostoti celic v suspenziji celične kulture smo po enačbi 2 izračunali volumen celične kulture, ki je vseboval želeno število celic za prenos:

$$\text{enačba: } c_1 * V_1 = c_2 * V_2 \quad \dots (2)$$

Legenda: c_1 = koncentracija celične kulture (št. celic/ml), V_1 = volumen celične kulture (ml), c_2 = končna koncentracija celic v suspenziji (št. celic/ml), V_2 = končni volumen celične kulture po kultivaciji (ml).

2.2.5 Transfekcije

2.2.5.1 Priprava vektorja

Plazmidni vektor, *CompoZr Custom Zinc Finger Nucleases*, cat: SAFCZFN-1kt s koncentracijo 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (*Sigma Aldrich*), smo linearizirali z restrikcijskim encimom *SwaI*. Reakcijsko mešanico plazmidnega vektorja, encima z reakcijskim pufrom in vode, proste nukleaz, smo inkubirali čez noč pri 25 °C. Mešanici smo nato dodali enak volumen izopropanola, premešali, centrifugirali (30 min, 21000 g, 4 °C), odstranili supernatant, dodali začetni volumen ledeno hladnega 70 % etanola, centrifugirali (1 min, 21000 g, 4 °C), odstranili supernatant, pelet posušili v mikrobiološki komori in sušino DNA raztopili v 100 μL vodi. Čistost in koncentracijo smo določili spektrofotometrično na spektrofotometru Nanodrop 1000, uspešnost linearizacije pa z elektroforezo na 0,8 % agaroznem e-gelu.

Preglednica 3: Restrikcijska mešanica

Komponenta	Volumen (μl)
plazmidni vektor <i>CompoZr ZFN</i> (1 μg)	1
restrikcijski encim <i>SwaI</i> (10000 enot/ml)	0,5
10 x restrikcijski pufer	2
voda, prosta nukleaz	16,5
končni volumen	20

2.2.5.2 Transfekcije sesalskih celic

CHO Der2 in *CHO Der3* smo transficirali z lineariziranim plazmidnim vektorjem, opravili smo tudi kontrolni transfekciji. Pri pozitivni kontroli smo uporabili vektor GFP (*green fluorescence protein*), negativno kontrolo pa smo opravili brez prisotnosti vektorja. Za postopek ene transfekcije smo potrebovali $5 \cdot 10^6$ celic. Kulturo smo centrifugirali (5 min, 180 g, 20 °C), odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 90 μ l transfekcijske raztopine (pri negativnih kontrolah 100 μ l) ter dodali 3 μ g vektorja. Dobro premešano mešanico smo prenesli v nukleofekcijsko kiveto, opravili postopek transfekcije na nukleofektorju, nato pa vsebino iz kivete s sterilno pipeto prenesli neposredno v rastno platenko.

Preglednica 4: Seznam izvedenih transfekcij

Št.	Celice	Število celic	Vektor	Pool
1	<i>CHO Der2</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	pDNA ZFN	ZFN pDNA <i>Der2</i>
2	<i>CHO Der2</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	GFP	+ kontrola, <i>Der2</i>
3	<i>CHO Der2</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	/	– kontrola <i>Der2</i>
4	<i>CHO Der3</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	pDNA ZFN	ZFN pDNA <i>Der3</i>
5	<i>CHO Der3</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	GFP	+ kontrola GFP <i>Der3</i>
6	<i>CHO Der3</i>	$5 \cdot 10^6$ vc/ml	/	– kontrola <i>Der3</i>

Uspešnost transfekcij smo preverili v 72 urah po postopku transfekcije. Na pretočnem citometru smo določili delež uspešno transficiranih in delež živih celic znotraj mešane populacije celic z oznakama »+ kontrola *Der2*« in »+ kontrola *Der3*«. Delež živih celic in odsotnost vektorja smo določili na negativnih kontrolah z oznakami »– kontrola *Der2*« in »– kontrola *Der3*«.

2.2.6 Kloniranje

Kloniranje z robotom *Clone Pix FL* je avtomatiziran proces kloniranja sesalskih celic in je alternativa kloniranju z redčenjem (*angl. limiting dilution*).

2.2.6.1 Nacepitev sesalskih celic v poltrdni rastni medij

Četrty dan po transfekciji smo celični kulturi z oznakama *ZFN pDNA Der2 in ZFN pDNA Der3* nacepili na poltrdni rastni medij. Imobilizacija celic v poltrdnem rastnem mediju omogoči oblikovanje kolonij. Najprej smo pripravili mešanico poltrdnega rastnega medija, pri čemer smo uporabili 4-krat koncentrirani osnovni rastni medij z dodatki, kondicioniran medij in *Clone-matrix (Genetix)*. Tako pripravljene mešanice poltrdnega rastnega medija smo dodali celice s končno koncentracijo 50 celic/ml. Celotno mešanico medija s celicami smo dobro, a nežno premešali in jo z 10 ml stripeto prenesli (2ml/vdolbinico) v rastne ploščice s 6 vdolbinicami. Iz mešanice medija s celicami za posamezno celično linijo smo nacepili 7 rastnih ploščic. V stranske rezervoarje ploščic smo nanесли avtoklavirano vodo zaradi potreb vlaženja ter ploščice postavili v inkubator (37 °C, 10 % CO₂).

Na učinkovitost rasti kolonij opazno vplivajo prvi dnevi inkubacije, zato smo morali zagotoviti čim manj stresne okoliščine, kar vključuje čim manj pogosto odpiranje inkubatorja, velika vlažnost in čim bolj statično inkubacijo, zato smo ploščice prvič pod mikroskopom pregledali po približno 7 dneh.

2.2.6.2 Kloniranje z robotom Clone Pix FL

Z robotom *Clone Pix FL (Genetix)* smo 12. dan opravili postopek kloniranja. Pred vstavitvijo rastnih ploščic v robota smo iz stranskih rezervoarjev odpipetiral vodo ter dno ploščic očistili s 70 % etanolom. Pripravili smo si zadostno število mikrotitrskih ploščic s 96 vdolbinicami s po 100 µl tekočega rastnega medija/jamico. Nato je robot z zajemom slik površine rastnih ploščic določil velikost, obliko in razdaljo med sosednjimi kolonijami. Glede na zelene parametre je program opravil izbor vseh kolonij, ki bi bile primerne za prenos, ter jih po pregledu tudi avtomatizirano prenesel v ploščice s 96 vdolbinicami.

2.2.7 Gojenje sesalskih celic v mikrotitrskih ploščicah

Med gojenjem kolonij v mikrotitrskih ploščicah smo ploščice fotografirali na napravi *Clone Select Imager (Genetix)*, ki je naprava za slikovni zajem mikrotitrskih ploščic za določanje

konfluentnosti in monoklonalnosti. Glede na zbrane podatke smo celice gojili z dodajanjem ravnega medija in po 4–5 dneh oz. ko so kolonije dosegle zadostno konfluenco klone prenesli najprej v mikrotiterske ploščice s 24 vdolbinicami (*Corning*) in pozneje v ploščice s 6 vdolbinicami (*Corning*) vse do ravnih platenk. Ob prenosu v ploščico s 24 vdolbinicami smo kolonije tudi poimenovali z zaporedno številko prenosa.

Preglednica 5: Število pridobljenih klonov od kloniranja do ravnih platenk

Celična linija	CHO <i>Der2</i>	#	CHO <i>Der3</i>	#
Oznaka ploščic 6 W (poltrdno)	ZFN_ <i>Der2</i> _6W_1 do 7	50 celic/ml	ZFN_ <i>Der3</i> _6W_1 do 7	50 celic/ml
ClonePixFL	Robotski prenos		Robotski prenos	
Oznaka ploščic 96 W	ZFN_ <i>Der2</i> _96W_1 do 3	190 klonov	ZFN_ <i>Der3</i> _96W_1 do 3	200 klonov
Oznaka ploščic 24 W	ZFN_ <i>Der2</i> _24W_1 do 7	140 klonov	ZFN_ <i>Der3</i> _96W_1 do 8	130 klonov
Oznaka ploščic 6 W	ZFN_ <i>Der2</i> _6W_1 do 28	88 klonov	ZFN_ <i>Der3</i> _6W_1 do 32	112 klonov
Oznake ravnih platenk	CHO_ <i>Der2</i> do 118	85 klonov	CHO_ <i>Der3</i> do 109	109 klonov

2.2.8 Priprava celičnih peletov za izolacijo gDNA

Za izolacijo genomske DNA smo pripravili celični pelet s $5 \cdot 10^6$ celic/klon, tako da smo celično kulturo aseptično prenesli v centrifugirko, centrifugirali (180 g, 5 min, 4 °C), odlili supernatant in pelet sprali v ohlajenem PBS. Celično suspenzijo smo spet centrifugirali in

postopek spiranja še enkrat ponovili. Tako pripravljene celice smo uporabili pri izolaciji na aparaturi *QiaCube* (*Qiagen*).

2.2.9 Izolacija gDNA z robotom QIAcube in kompletom reagentov QIAmp Blood Mini

Aparatura QIAcube je namenjena izolaciji RNA, gDNA, pDNA, virusnih nukleinskih kislin in proteinov ter za čiščenje DNA in RNA iz gela. Za izolacijo smo uporabljali komplet reagentov *QIAmp DNA Blood Mini Kit* proizvajalca *Qiagen*, ki omogoča hitro in preprosto izolacijo genomske DNA iz celic od $5 \cdot 10^6$ do $1 \cdot 10^7$ (po protokolu QIAmp blood mini kit).

Zagon robota vključuje pripravo potrebnih reagentov, ki jih potrebuje med izolacijo (96 % etanola, vodo, prosto nukleaz, pufre za spiranje, RNAza), in celice, sprane v PBS. Postopek izolacije gDNA robot *QiaCube* v celoti opravi samodejno, postopek pa se začne z lizo celic, nato vzorci prehajajo skozi kolonice, med tem se DNA molekule vežejo na membrano kolonice iz silikagela, proteini in druge nečistoče pa se med centrifugiranjem sperejo. Poleg DNA se na membrano veže tudi RNA, zato je del postopka tudi tretiranje vzorca DNA z RNAzo.

Po končanem postopku izolacije smo izmerili koncentracijo vodne raztopine z gDNA in vzorce shranili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.10 Spektrofotometrično določanje koncentracije izolirane gDNA

Koncentracijo izolirane gDNA smo izmerili spektrofotometrično na spektrofotometru *NanoDrop 1000*. Spektrofotometer se uporablja za merjenje koncentracij nukleinskih kislin z visoko občutljivostjo v območju od 5 do 3000 ng/ μl . Spektrofotometrično določanje koncentracije temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca.

Pričakovane in dejansko določene koncentracije izolirane gDNA so bile okrog 150 ng/ μl .

2.2.11 Tehnologija nukleazni test Cel-I (Mutation detection kit, Surveyor)

2.2.11.1 Raztapljanje oligonukleotidnih začetnikov PCR

Liofilizirane oligonukleotidne začetnike smo raztopili v ustrezni količini vode, proste nukleaz, stresali (1 ura, 300 rpm, 24 °C) na *Eppendorf thermomixerju* in iz tako pripravljenih založnih raztopin (100 µM) pripravil 10 µM delovne raztopine.

2.2.11.2 Optimizacija temperature prileganja začetnih oligonukleotidov

Najprej smo optimizirali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov med verižno reakcijo s polimerazo. Optimizacijo smo opravili z različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri temperaturnem gradientu med 50 in 70 °C na *Eppendorf Mastercycle pro S*. Uspešnost prileganja začetnih oligonukleotidov smo nato preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Kot matrično DNA smo med optimizacijo uporabili izolirano gDNA netransficiranih oz. parentalnih celic *CHO Der2* in *CHO Der3*.

Preglednica 6: Seznam začetnih oligonukleotidov, uporabljenih med optimizacijo temperature

Začetni oligonukleotidi	Pričakovana velikost pomnoženega fragmenta
Oligonukleotidni par 1 (FP/RP)	~ 86 bp
Oligonukleotidni par 2 (FP/RP)	~ 120 bp
Oligonukleotidni par 3 (FP/RP)	~ 68 bp
Oligonukleotidni par 4 (FP/RP)	~ 427 bp
Oligonukleotidni par 5 (FP/RP)	~ 645 bp

Par začetnih oligonukleotidov je sestavljen iz smiselnega začetnega oligonukleotida FP (*angl.* forward primer) in protismiselnega začetnega oligonukleotida RP (*angl.* reverse primer).

Reakcijske mešanice smo pripravljali v 0,2 ml mikrocentrifugirkah s končnim volumnom 50 µl. Reagente smo dodajali po vrstnem redu v preglednici 6.

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za eno reakcijo PCR

Komponenta	Volumen za 1 reakcijo (µl)
voda, prosta nukleaz	32
10 x polimerazni pufer	5
dNTP (10 µM)	4
matrična gDNA (50 ng/µl)	2
FP (10 µM)	2,5
RP (10 µM)	2,5
polimeraza Pfu Turbo (2,5 enot/µl)	2
Končni volumen	50

Preglednica 8: Programa, uporabljena pri optimizaciji temperature začetnih oligonukleotidov

Stopnja programa	PCR-program 1	PCR-program 2
1	95 °C, 1 min	95 °C, 1 min
2	95 °C, 45 s	95 °C, 45 s
3	temperaturni gradient: 50–60 °C, 1 min	temperaturni gradient: 60–70 °C, 1 min
4	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
5	stopnja 2–4, 30 ponovitev	stopnja 2–4, 30 ponovitev
6	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
7	4 °C, ∞	4 °C, ∞

Pri PCR-programu 1 smo stopnjo programa prileganja začetnih oligonukleotidov nastavili na temperaturni gradient med 50 in 60 °C, pri programu PCR 2 pa med 60 in 70 °C.

Preglednica 9: Shematski prikaz obeh temperaturnih gradientov (50–60 °C in 60–70 °C)

Temperaturni gradient: 50–60 °C												
Pozicija	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	50,0	/	50,8	/	52,8	/	55,4	56,7	/	58,8	/	59,9
Temperaturni gradient: 60–70 °C												
Pozicija	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura (°C)	59,9	/	60,7	/	62,7	/	65,4	66,7	/	68,9	/	69,9

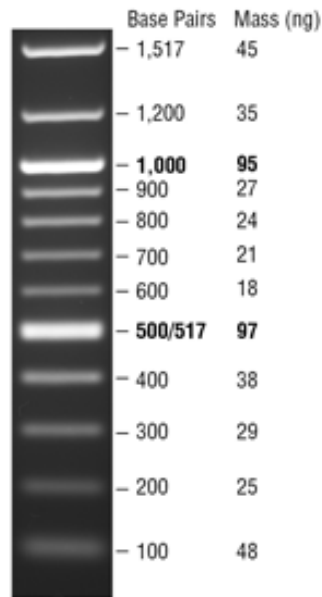
2.2.11.3 Elektroforeza na agaroznem gelu

Po opravljeni verižni reakciji s polimerazo smo uspešnost in velikost namnoženih PCR-produktov preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Pri tem smo uporabili e-gel, ki je komercialno dostopen sistem agarozne gelske elektroforeze (*Life Technologies*). E-gel je sestavljen iz prej pripravljene agarozne kasete (v našem primeru smo uporabili 2 % agarozni gel), v kateri je barvilo sybr safe. Sistem je namenjen zaznavanju nukleinskih kislin velikosti od 20 kb do 10 kb. Elektroforeza traja 30 minut pri standardni napetosti (80 V) v temnem prostoru.

Preglednica 10: Mešanica za nanos na elektroforezni gel

Komponenta	Volumen (µl)
voda, prosta nukleaz	19
vzorec	1
6 x DNA Loading Dye	4

Poleg vzorcev smo na gel nanесли še standard velikosti 100 bp (*New England Biolabs*), s katerim smo potrdili pričakovane velikosti fragmentov.



Slika 14: Standard velikosti 100 baznih parov (www.neb.com, junij 2012)

Po poteku elektroforeze smo e-gel slikali in dokumentirali na napravi za slikanje elektroforeznih gelov LAS-4000 (*Fujifilm*). Iz rezultatov (fotografije e-gela) smo izbrali optimalno temperaturo prileganja pri določenem paru začetnih oligonukleotidov. Če je prišlo do prileganja začetnih oligonukleotidov in je bila temperatura prileganja optimalna, so bili vidni intenzivni fragmenti pričakovanih velikosti za posamezni par začetnih oligonukleotidov.

Postopek optimizacije temperature prileganja začetnih oligonukleotidov smo sklenili s potrditveno PCR-analizo, pri kateri smo na izolirani gDNA parentalnih celičnih linij CHO *Der2* in CHO *Der3* še enkrat ponovili PCR z izbrano temperaturo prileganja pri 60,5 °C in začetnimi oligonukleotidi z oznako Oligonuklotidni par 4. Reakcijska mešanica: glej preglednico 7; PCR program: glej preglednici 9 oz. 11.

2.2.11.4 Namnoževanje PCR-produkta

Pred obdelavo z nukleazo Surveyor smo namnožili PCR-produkt na izolirani gDNA klonov. Za reakcijsko mešanico glej preglednico 7.

Preglednica 11: PCR-program, uporabljen pri pomnoževanju produkta na ravni klona

Stopnja programa	PCR-program
1	95 °C, 1 min
2	95 °C, 45 s
3	60,5 °C, 1 min
4	72 °C, 1 min
5	Stopnja 2–4, 30 ponovitev
6	72 °C, 10 min
7	4 °C, ∞

2.2.11.5 Nukleazni test CELL-I

a) Obdelava z nukleazo Surveyor

Postopek smo opravili po priloženih navodilih proizvajalca *Surveyor mutation detection kit (Transgenomic)*.

Kontrole: kompletu reagentov priloženi *kontrola C* in *kontrola G* sta mešanici umetno pripravljenih nukleotidnih zaporedij. Kontrola se razlikujeta le v enem nukleotidu, zato ob mešanju in hibridizaciji ni popolnega parjenja vseh nukleotidnih parov. Po tretiranju z *nukleazo Surveyor* se tvorijo dodatni fragmenti, ki so posledica zaznave točkovnih mutacij heterodupleksnih kompleksov. Kontrola se uporabljata za preverjanje uspešnosti postopka hibridizacije in tretiranja vzorcev z *nukleazo Surveyor*.

Najprej smo kontrola namnožil z metodo PCR in ju pozneje uporabili kot kontrola med analizo na klonih.

b) Hibridizacija

Vzorec: za postopek detekcije mutacij pri enem vzorcu smo potrebovali 200 ng PCR-produkta (pomnožen z izbranimi začetnimi oligonukleotidi pri optimalni temperaturi prileganja).

Koncentracijo PCR-produkta smo ocenili na agaroznem gelu s primerjanjem intenzitete fragmentov vzorca in standarda velikosti 100 bp (slika 14). Glede na ocenjene koncentracije smo določili volumne z zadostno količino PCR-produkta in preračunani volumen uporabili pri hibridizaciji.

Kontrola: v 0,2 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali 30 μ L PCR-produkta kontrole C, 30 μ L PCR-produkta kontrole G in 30 μ L mešanice obeh kontrol.

Program hibridizacije za vzorec in kontrolo smo izvedli na *Eppendorf Mastercycle pro S* (preglednica 12).

Preglednica 12: Program hibridizacije

Stopnja programa	PCR-program
1	95 °C, 10 min
2	95 °C do 85 °C (-2,0 °C/s)
3	85 °C, 1 min
4	85 °C do 75 °C (-0,3 °C/s)
5	75 °C, 1 min
6	75 °C do 65 °C (-0,3 °C/s)
7	65 °C, 1 min
8	65 °C do 55 °C (-0,3 °C/s)
9	55 °C, 1 min
10	55 °C do 45 °C (-0,3 °C/s)
11	45 °C, 1 min
12	45 °C do 35 °C (-0,3 °C/s)
13	35 °C, 1 min
14	35 °C do 25 °C (-0,3 °C/s)
15	25 °C, 1 min
16	4 °C, ∞

c) Obdelava z nukleazo

Vzorec: po programu hibridizacije smo vsakemu vzorcu dodali 1/10 volumna 0,15 M raztopine $MgCl_2$, 1 μl raztopine *Surveyor Enhancer S* in 1 μl *Surveyor Nuclease S*.

Kontrola: hibridiziranim raztopinam kontrol smo dodali 3 μl 0,15 M raztopine $MgCl_2$, 1 μl *Surveyor Enhancer S* in 1 μl *Surveyor nukleaze*.

Mešanice smo nežno premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 60 min pri 42 °C na *Eppendorf Mastercycle pro S*.

Po inkubaciji smo vzorcem in kontrolam dodali 1/10 volumna raztopine *Surveyor stop solution*, mešanice nežno premešali na vibracijskem mešalniku in nadaljevali preverjanje z elektroforezo na agaroznem gelu.

d) Analiza rezultatov z elektriforezo na agoroznem gelu

Mešanice za nanos na gel smo pripravili po preglednici 10. Elektroforezo in dokumentiranje rezultatov pa smo izvedli, kot je opisano v poglavju 2.2.11.3.

2.2.12 Preverjanje števila kopij gena s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času

Uspešnost izbivanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov smo za vsak posamezen klon ovrednotili z določitvijo števila kopij ciljnega gena po analizi s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR). Za detekcijo smo uporabili specifično metodo določanja pomnožkov (kemija TaqMan). Za analizo rezultatov pa smo uporabili absolutno kvantifikacijo.

2.2.12.1 Začetni oligonukleotidi in sonde

Uporabljali smo dva seta začetnih oligonukleotidov s sondami; glej preglednico 13. Prvi set je bil namenjen detekciji ciljnega gena, na katerem je nukleaza z motivi cinkovih prstov

povzročila mutacije. Sonda je bila načrtovana tako, da se je vezala na območje reza (*angl.* cutting site) nukleaze z motivi cinkovih prstov, saj smo si le tako zagotovili specifičnost zaznave. Drugi set je bil načrtovan za zaznavo endogenega gena (GLUC), ki je predstavljal referenčni gen. Začetne oligonukleotide in sonde smo načrtovali s programom Primer Express 2.0 (Applied Biosystems).

Preglednica 13: Začetni oligonukleotidi in sonda za qPCR

Amplikon	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje
amplikon na analizirani regiji (ZFN target)	5'-zač. oligonukleotid	GCCCCAGCTCGGACATG
	3'-zač. oligonukleotid	CCTTGCAGGGCGAGCA
	sonda	CCGGCTGCTGCTGCT
endogeni gen: glukagon (GLUC)	5'-zač. oligonukleotid	ATTGCCAAACGCCACGAT
	3'-zač. oligonukleotid	CCAAGCAATGAATTCCTTTGC
	sonda	CTGAAGGGACCTTTACCA

2.2.12.2 Priprava reakcij

Delo je potekalo v mikrobiološki komori (MBK) in laminariju. Laminarij smo pred delom dekontaminirali z UV-lučjo. Priprava izoliranih nukleinskih kislin je potekala v MBK, priprava reakcijskih mešanic in dodajanje vzorcev pa v laminariju (s tem smo preprečili navkrižne kontaminacije). Uporabljali smo mikrotitrne ploščice s 384 vdolbinicami (volumen reakcijskih mešanic je bil 10 µl, sestava reakcijske mešanice pa je prikazana v preglednici 14). Redčine in prenos vzorcev na mikrotitrne ploščice s 386 vdolbinicami smo opravili s pipetirnim sistemom CAS-1200N (Corbett).

Za pripravo reakcij smo uporabili TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems). Ta že vsebuje AmpliTaq gold® DNA-polimerazo, dNTP, pasivno referenco ROX, encim uracil-DNA-N-Glikozilazo (UNG), ki preprečuje kontaminacijo s PCR-produkti in optimizirane komponente pufra.

Vzorci

Uporabili smo izolirano gDNA, umerjeno na 100 ng/ μ l. 10 x redčine vzorcev smo nanesti na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami, nato pa je pipetirni robot vsak vzorec še 10 x redčil. Obe redčitvi (10 \times , 100 \times) sta bili nato uporabljeni v reakcijskih mešanicah na 384 mikrotitrski ploščici po preglednici 14.

Preglednica 14: Sestava qPCR reakcijske mešanice na 384 mikrotitrski ploščici.

Komponenta	Volumen za 1 reakcijo (μl)
TaqMan Master Mix	5
5'-začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,9
3'-začetni oligonukleotid (10 μ M)	0,9
sonda (10 μ M)	0,2
vzorec	3
Skupaj	10

Negativna kontrola

Negativne kontrole (NTC) smo pripravili enako kot reakcijske mešanice, le da smo namesto vzorca v reakcijsko mešanico dodali avtoklavirano vodo. Negativna kontrola pomeni kontrolo kontaminacij z izolirano DNA med delom.

Standardna krivulja

Za izdelavo standardnih krivulj za endogeni gen GLUC in ciljni gen smo uporabili genomsko DNA celic CHO *Der1*. Uporabili smo gDNA, umerjeno na 100 ng/ μ l, ter iz 5 razredčin (10 \times , 50 \times , 100 \times , 500 \times , 1000 \times) generirali standardno krivuljo. Za vsako razredčino smo pripravili 3 paralelke reakcijskih mešanic.

Po zaključku pipetirnega sistema smo ploščice s 384 vdolbinicami dobro zalepili z optično folijo, centrifugirali (3000 rpm, 2 min, sobna temperatura) in analizirali na aparaturi Real-Time PCR ABI Prism 7900HT.

2.2.12.3 Potek reakcij

Verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo izvedli na instrumentu ABI Prism®7900HT Sequence detection system (Applied Biosystems).

V računalniškem programu SDS 2.2 smo v shemo ploščice vnesli imena vzorcev in njihove razredčine, določili detektorje in pogoje pomnoževanja. Uporabljali smo univerzalne pogoje pomnoževanja, ki so podani v preglednici 15.

Preglednica 15: Pogoji pomnoževanja pri metodi qPCR

Začetni koraki		40 ciklov	
aktivacija nukleaze UNG	aktivacija AmpliTaq Gold DNA polimeraze	denaturacija	prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje
2 min, 50 °C	10 min, 95 °C	15 s, 95 °C	1 min, 60 °C

Pomnoževanje s kemijo TaqMan traja 1 uro in 30 min.

2.2.12.4 Obdelava podatkov

Po končani analizi smo v računalniškem programu SDS 2.2 preverili pravilnost poteka analize tako, da smo preverili krivuljo pomnoževanja, pravilnost multikomponentnega grafa barvil in Ct-vrednosti. Ct-vrednosti smo nato prenesli v program Microsoft Excel in jih obdelali.

Glede na izhodno koncentracijo referenčnih vzorcev smo izračunali število kopij endogenega in ciljnega gena v različnih razredčinah ($10 \times$, $50 \times$, $100 \times$, $500 \times$, $1000 \times$) in generirali standardno krivuljo. Število kopij vzorca za standardno krivuljo smo izračunali po enačbi 3 z upoštevanjem velikosti genoma kitajskega hrčka (*Cicetulus griseus*).

Standardna krivulja je narejena tako, da so na x-osi logaritemske (\log_{10}) vrednosti števila kopij v reakciji in na y-osi pripadajoče Cq-vrednosti. Linearna korelacija med obema parametroma predstavlja premica – standardna krivulja.

Zahteve za pravilno standardno krivuljo so:

- Standardna krivulja je skonstruirana iz najmanj 3 točk, ki pokrivajo območje kvantifikacije.
- $R^2 \geq 0,99$ točke se dobro prilegajo standardni krivulji, zato je ta točna.
- Naklon standardne krivulje je med $-3,1$ in -4 .
- Enakomerni razmiki med točkami standardne krivulje.

Iz enačbe premice standardne krivulje smo določili število kopij endogenega gena v vzorcu (GLUC) in število kopij ciljnega gena v vzorcu. Število kopij ciljnega gena, ki smo ga določili v vzorcu, smo delili s številom kopij endogenega gena v vzorcu in tako dobili število kopij ciljnega gena na haploidni genom celice.

Enačba: Primer izračuna števila kopij za pripravo standardne krivulje ... (3)

dolžina genoma kitajskega hrčka (*Cricetulus griseus*) = $3,55 \cdot 10^9$ bp

1 bp = 618 g/mol

M (1 kopija genoma) = $3,55 \cdot 10^9$ bp * 618 g/mol/bp = $2,194 \cdot 10^{12}$ g/mol

M (1 kopija genoma) = $1/N_A \cdot M$ (1 kopija genoma) = $(1/6,023 \times 10^{23}/\text{mol}) * 2,194 \cdot 10^{12}$ g/mol
= $3,64 \cdot 10^{-12}$ g = 3,64 pg

Tako ima vsaka diploidna celica hrčka 2 x 3,64 pg DNA.

3 REZULTATI

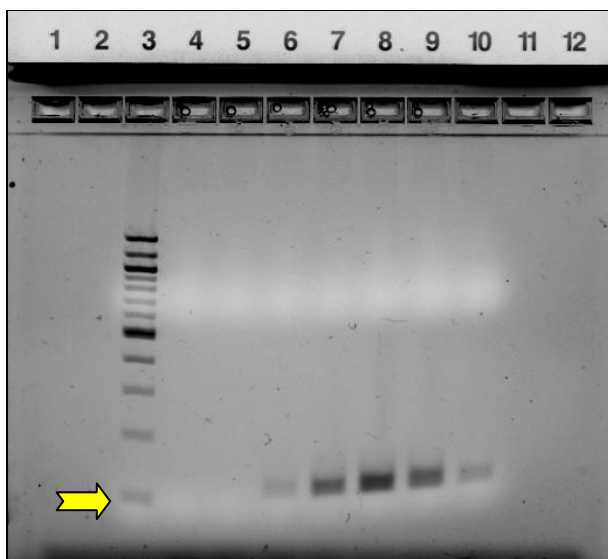
3.1 OPTIMIZACIJA PCR

Pri optimizaciji smo testirali več različnih parov začetnih oligonukleotidov (Oligo-par od 1 do 5), katerih PCR-produkti se razlikujejo v dolžini baznih parov, in več različnih temperatur prileganja. Vzorce smo na agarozne gele nanašali po shemi temperaturnega gradienta, pričakovane velikosti fragmentov pa smo ocenili glede na standard velikosti 100 bp. Optimizacijo smo opravili na izolirani genovski DNA parentalnih celic celične linije CHO *Der2*, izbrane parametre in pare začetnih oligonukleotidov pa potrdili tudi na CHO *Der3*.

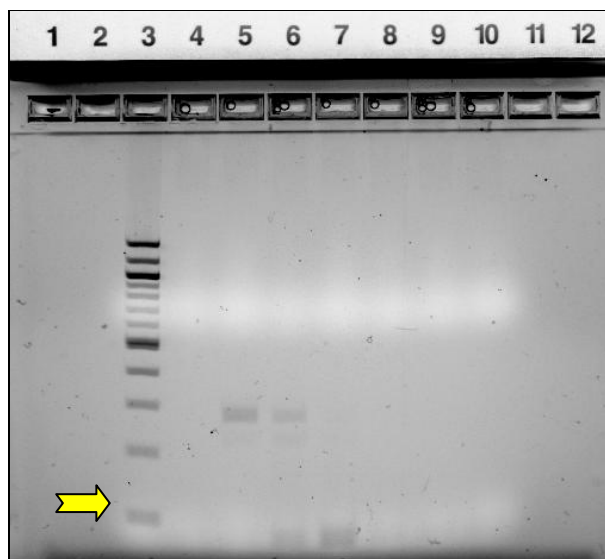
Z optimizacijo PCR smo pridobili specifičen PCR-produkt pričakovane velikosti, ki smo ga izbrali po testiranju različnih parov začetnih oligonukleotidov in različne temperature prileganja. Specifičen PCR-produkt bomo pozneje uporabil kot matrico za nukleazni test Cel-I, za identifikacijo klonov, pri katerih je prišlo do mutacije ciljnega gena po delovanju ZFN.

Rezultati optimizacije so specifični PCR-produkti, ki so prikazani kot slikovni zajemi e-gelnih kaset, pridobljeni z napravo za slikanje agaroznih gelov LAS-4000 (film Fuji). Sosledje vzorcev na gelu se ujema s shemo gradienta temperature na Eppendorf Mastercycle pro S (preglednica 8).

Temperaturni gradient: 50–60 °C, celična linija CHO Der2

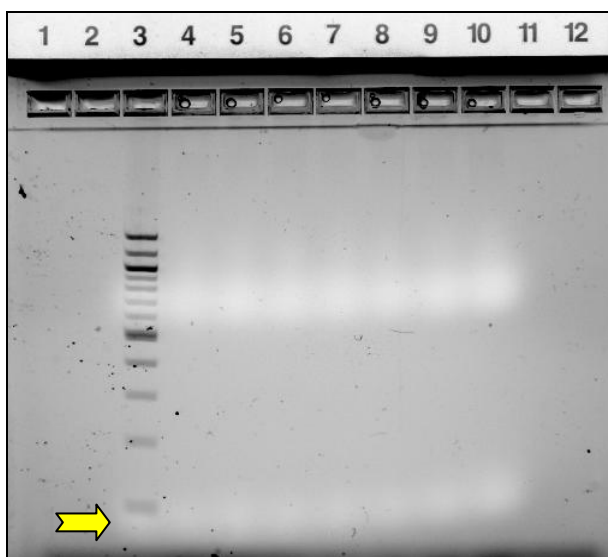


Slika 15: E-gel 1, Oligonukleotidni par 1, pričakovana velikost 86 bp

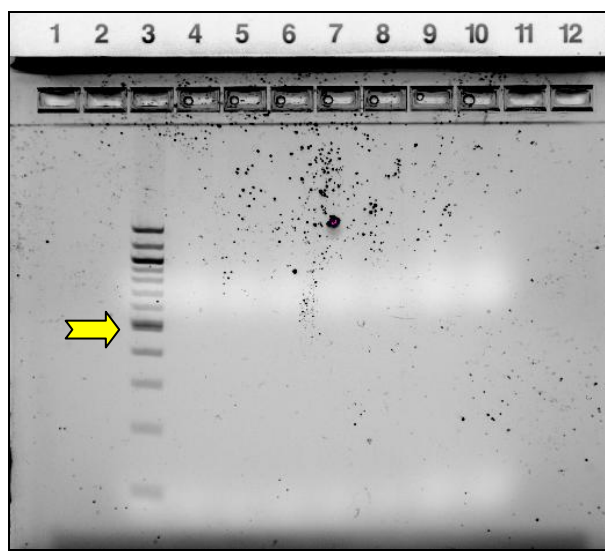


Slika 16: E-gel 2, Oligonukleotidni par 2, pričakovana velikost 120 bp

Na sliki 15 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 1 (86 bp) in na sliki 16 z uporabo Oligonukleotidnega para 2 (120 bp). Na obeh slikah so vzorci na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 50–60 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.

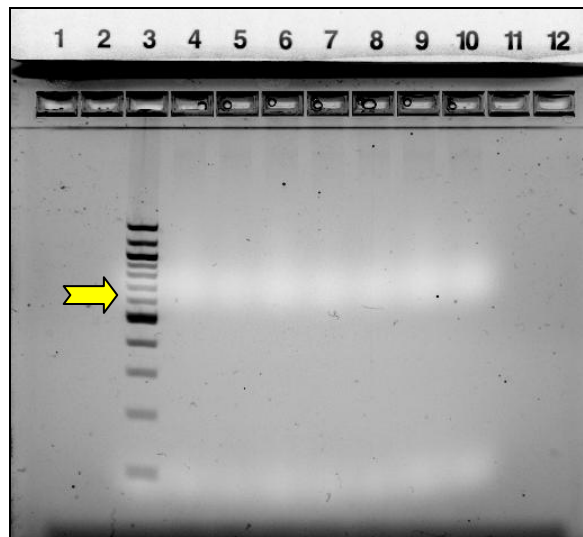


Slika 17: E-gel 3, Oligonukleotidni par 3, pričakovana velikost 68 bp



Slika 18: E-gel 4, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp

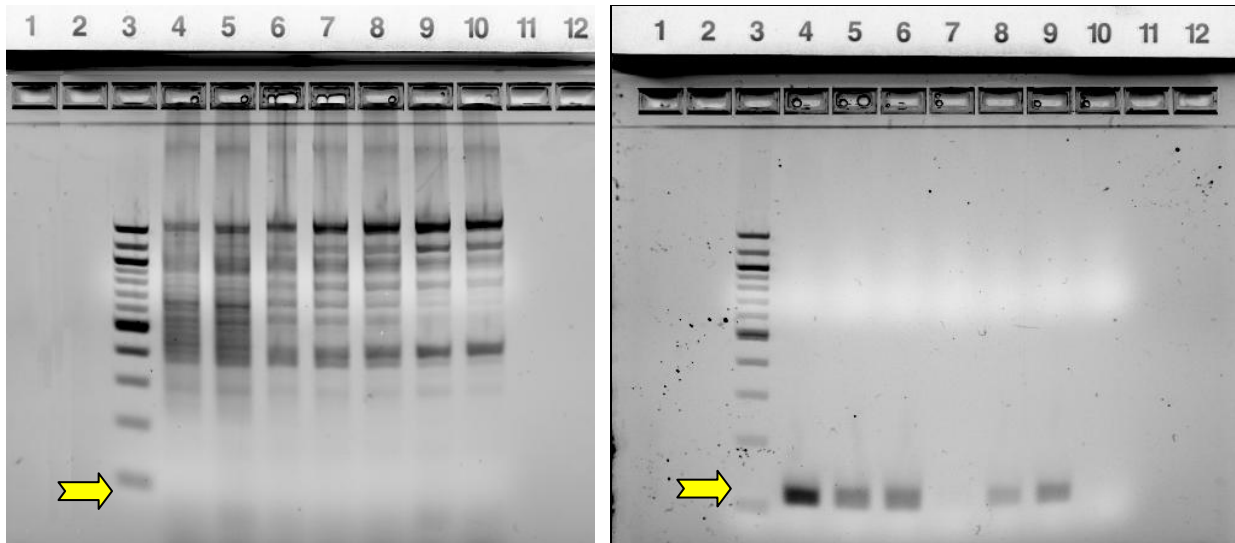
Na sliki 17 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 3 (68 bp) in na sliki 18 z uporabo Oligonukleotidnega para 4 (427 bp). Na obeh slikah so vzorci na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 50 – 60 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.



Slika 19: E-gel 5, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp

Na sliki 19 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 5 (645 bp). Vzorci do na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 50–60 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.

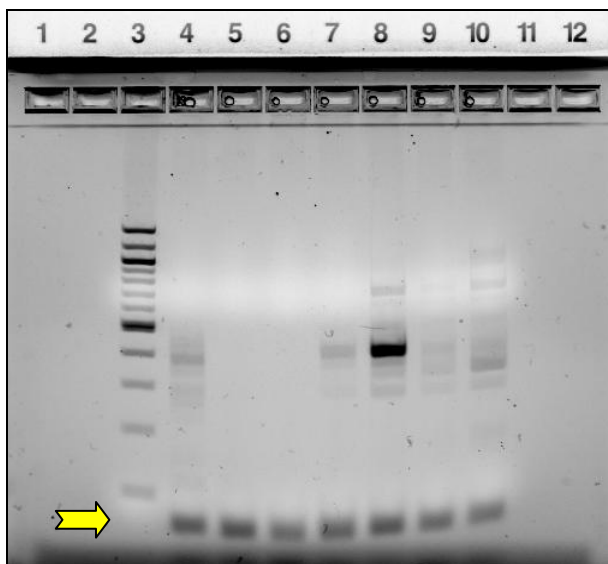
Temperaturni gradient: 60–70 °C, celična linija *CHO Der2*



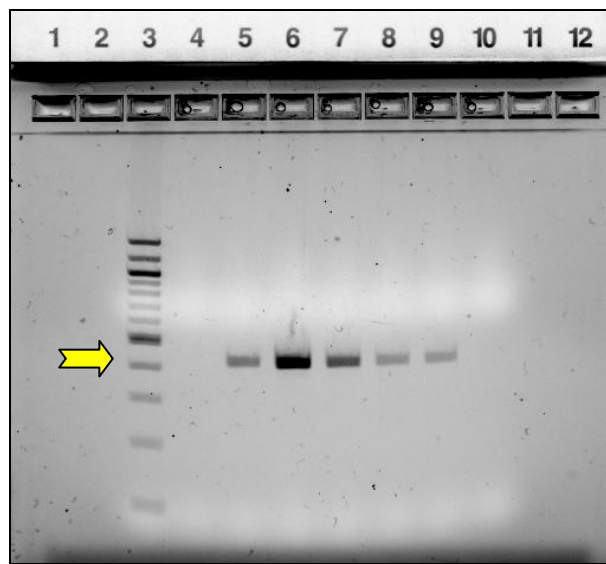
Slika 20: E-gel 6, Oligonukleotidni par 1,
pričakovana velikost 86 bp

Slika 21: E-gel 7, Oligonukleotidni par 2, pričakovana
velikost 120 bp

Na sliki 20 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 1 (86 bp) in na sliki 21 z uporabo Oligonukleotidnega para 2 (120 bp). Na obeh slikah so vzorci na stezah od 4 do 10 nanesei glede na shemo gradienta temperature 60–70 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.

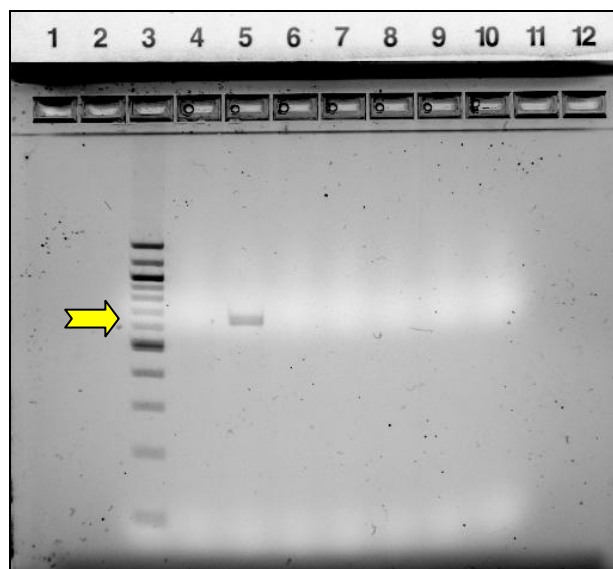


Slika 22: E-gel 8, Oligonukleotidni par 3, pričakovana velikost 68 bp



Slika 23: E-gel 9, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp

Na sliki 22 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 3 (68 bp) in na sliki 23 z uporabo Oligonukleotidnega para 4 (427 bp). Na obeh slikah so vzorci na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 60–70 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.



Slika 24: E-gel 10, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp

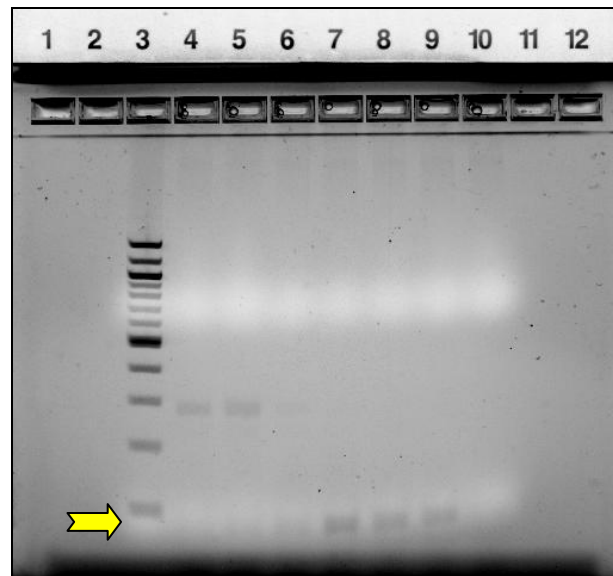
Na sliki 24 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 5 (645 bp). Vzorci so na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 60–70 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.

Pri optimizaciji PCR na celični liniji CHO *Der2* pri temperaturah med 50 in 70 °C so bile ustrezne dolžine fragmentov PCR-produkta glede na pričakovano velikost pri naslednjih parih začetnih oligonukleotidov in temperaturah prileganja:

- Oligonukleotidni par 1 pri temperaturah prileganja 52,8 °C, 55,4 °C, 56,7 °C, 58,8 °C in 59,9 °C (slika 15).
- Oligonukleotidni par 2 pri temperaturah prileganja 59,9 °C, 60,7 °C, 62,7 °C, 66,7 °C in 68,9 °C (slika 21).
- Oligonukleotidni par 4 pri temperaturah prileganja 60,7 °C, 62,7 °C, 65,4 °C, 66,7 °C in 68,9 °C (slika 23).
- Oligonukleotidni par 5 pri temperaturi prileganja 60,7 °C (slika 24).

Postopek optimizacije smo ponovili na izolirani genovski DNA parentalne celične linije CHO *Der3*, pri kateri smo uporabili samo tiste pare začetnih oligonukleotidov, ki so se uspešno prilegali med postopkom optimizacije pri CHO *Der2* (glej rezultate zgoraj).

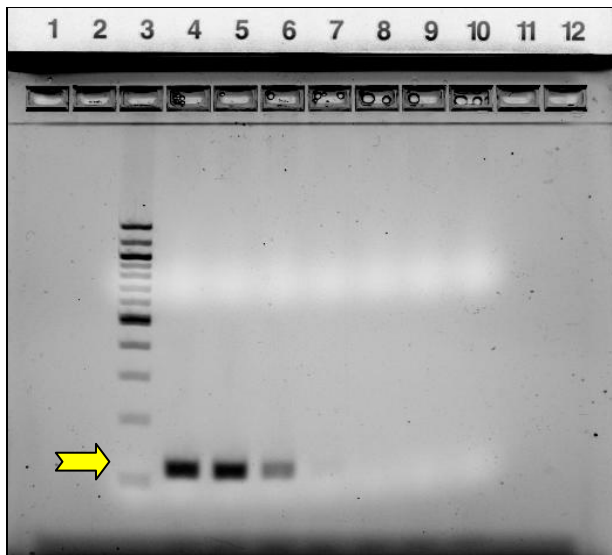
Temperaturni gradient: 50–60 °C, celična linija CHO *Der3*



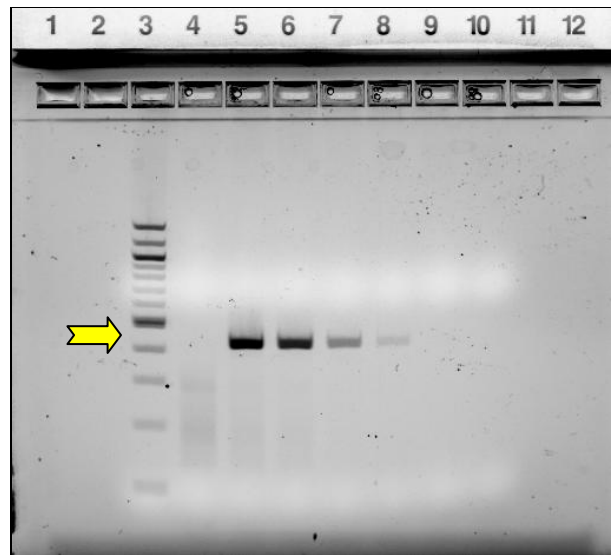
Slika 25: E-gel 11, Oligonukleotidni par 1, pričakovana velikost 86 bp

Na sliki 25 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 1 (86 bp). Vzorci so na stezah od 4 do 10 nanoseni glede na shemo gradienta temperature 50–60 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanosen standard velikosti 100 bp.

Temperaturni gradient: 60–70 °C, celična linija CHO *Der3*

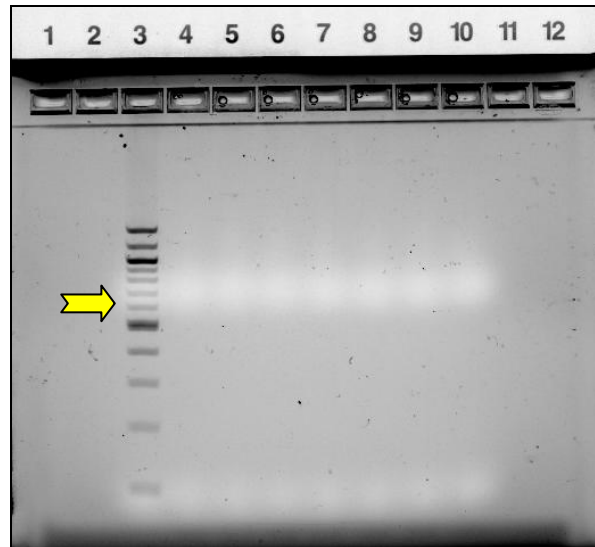


Slika 26: E-gel 12, Oligonukleotidni par 2, pričakovana velikost 120 bp



Slika 27: E-gel 13, Oligonukleotidni par 4, pričakovana velikost 427 bp

Na sliki 26 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 2 (120 bp) in na sliki 27 z uporabo Oligonukleotidnega para 4 (427 bp). Na obeh slikah so vzorci na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 60–70 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.



Slika 28: E-gel 14, Oligonukleotidni par 5, pričakovana velikost 645 bp

Na sliki 28 je z rumeno puščico označen pričakovan PCR-produkt z uporabo Oligonukleotidnega para 5 (645 bp). Vzorci so na stezah od 4 do 10 naneseni glede na shemo gradienta temperature 60–70 °C (preglednica 9). Na stezi 3 je nanesen standard velikosti 100 bp.

Pri optimizaciji PCR na celični liniji CHO *Der3* pri temperaturah med 50 in 70 °C so bile ustrezne dolžine fragmentov PCR-produkta glede na pričakovano velikost pri naslednjih parih začetnih oligonukleotidov in temperaturah prileganja:

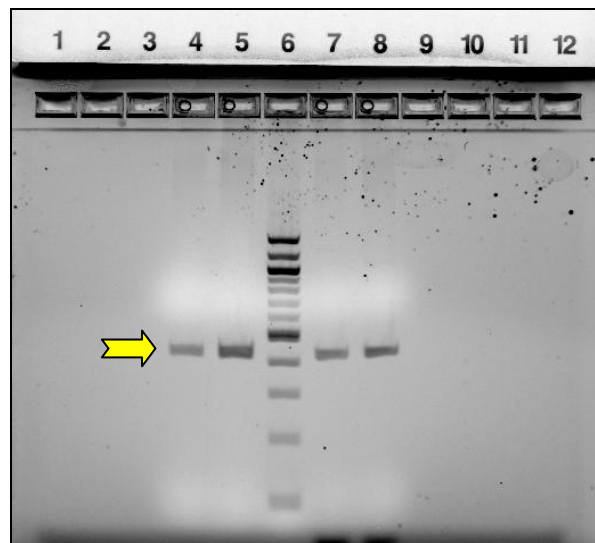
- Oligonukleotidni par 1 pri temperaturah prileganja 55,4 °C, 56,7 °C, 58,8 °C (slika 25).
- Oligonukleotidni par 2 pri temperaturah prileganja 59,9 °C, 60,7 °C in 62,7 °C (slika 26).
- Oligonukleotidni par 4 pri temperaturah prileganja 60,7 °C, 62,7 °C, 65,4 °C in 66,7 °C (slika 27).

Zaradi uspešnosti prileganja in pričakovanih velikosti PCR-produkta 427 bp pri večjem razponu temperaturnega gradienta pri obeh celičnih derivatih smo kot izbrani par začetnih oligonukleotidov pri pomnoževanju PCR-produkta z analiziranim genom izbrali oligonukleotidni par 4 z optimalno temperaturo prileganja 60,5 °C.

Za četrti par začetnih oligonukleotidov smo se odločili tudi zaradi dolžin fragmentov PCR-produkta. Menili smo, da bodo po tretiranju z *nukleazo Surveyor* razrezane polovice heterodupleksov laže opazne na gelski elektroforezi.

Potrditev temperature prileganja: 60,5 °C, celični liniji CHO *Der2* in CHO *Der3*.

Potrdili smo izbrane začetne oligonukleotide oligonukleotidnega para 4 pri temperaturi prileganja 60,5 °C. Vsak vzorec smo nato preverili na agaroznem gelu z različnima koncentracijama nanosa.



Slika 29: E-gel 15, PCR-produkt izbranega para začetnih oligonukleotidov

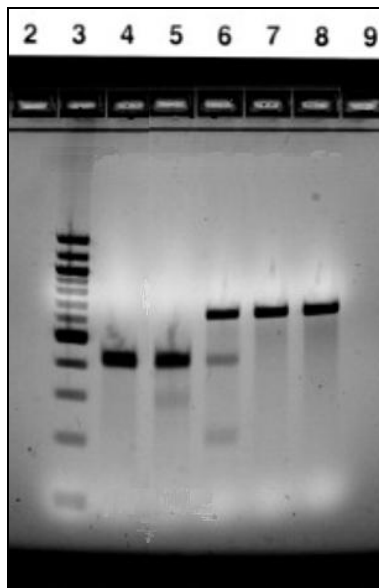
Na sliki 29 je prikazan PCR-produkt izbranega para začetnih oligonukleotidov (oligonukleotidni par 4) z optimalno temperaturo prileganja, pričakovana velikost 427 bp (označeno s puščico: →). Stezi 4 in 5: CHO *Der2* (prvo paralelko smo 1 x redčili); steza 6: standard velikosti 100 bp; stezi 7 in 8: CHO *Der3* (kot pri prvi celični liniji smo tudi tukaj prvo paralelko 1 x redčili).

Izbrani par začetnih oligonukleotidov z optimalno temperaturo prileganja smo potrdili, ker so na e-gelu 15 vidni fragmenti pričakovanih velikosti 427 bp.

3.2 NUKLEAZNI TEST CEL-I

3.2.1 Primerjava nukleaznega testa Cel-I in metode qPCR na mešani populaciji celic za testiranje delovanja ZFN

Pred postopkom kloniranja smo preverili delovanje nukleaz z motivi cinkovih prstov na mešani populaciji celic »pool«. Iz mešane populacije celic CHO *Der2*, ki je bila transficirana s pDNA ZFN in negativno kontrolo (netransficirane celice CHO *Der2*), smo izolirali genomsko DNA. Po namnoževanju PCR-produkta, hibridizaciji in postopku tretiranja z nukleazo Surveyor smo rezultat preverili na agarozni gelski elektroforezi (slika 30).



Slika 30: E-gel 16, preverjanje delovanja ZFN na mešani populaciji CHO *Der2* z nukleaznim testom Cel-I

Sosledje vzorcev na **e-gel 16**: steza 3: standard velikosti 100 bp; steza 4: – kontrola (netransficirane celice CHO *Der2*); steza 5: »pool« CHO *Der2* po transfekciji s pDNA ZFN; steza 6: kontrola G + C; steza 7: kontrola C; steza 8: kontrola G.

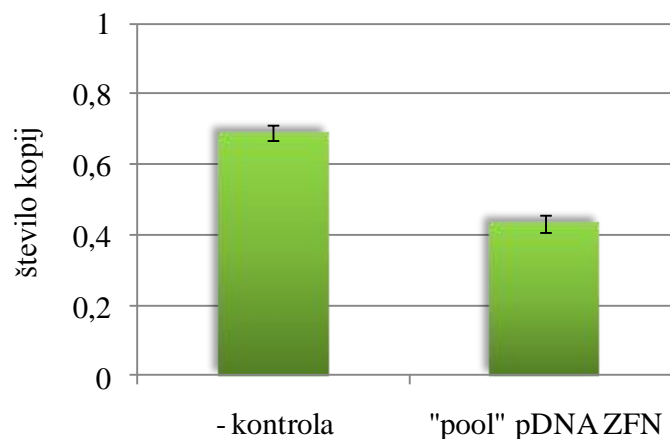
Zaradi dodatnih fragmentov pri mešani populaciji celic CHO *Der2*, transficirani s pDNA ZFN, ki jih opazimo pod PCR-produktom pričakovane velikosti na stezi 5, smo potrdili delovanje nukleaz z motivi cinkovih prstov na ravni mešane populacije, saj dodatni fragmenti

predstavljajo rezane heteroduplekse z nukleazo *Surveyor*, ki so nastali zaradi sprememb v nukleotidnem zaporedju.

Ker je velikost fragmentov PCR-produkta 427 bp, velikost dodatnih fragmentov, vidnih na e-gelu (slika 30, steza 5) približno 280 bp, je preostali delež tako okrog 140 bp (ni vidno na e-gelu). Glede na izbrani začetni oligonukleotidni par, PCR-produkt, mesto delovanja ZFN oz. mesto povzročitve točkovne mutacije, bi po obdelavi s testom Cel-I morali dobiti fragmente velikosti 300 bp in 127 bp, kar se ujema z rezultati.

S kontrolami C, G in C + G smo potrdili delovanje postopka nukleaznega testa Cel-I.

Enake vzorce smo nato anlizirali z metodo qPCR. Preračunali smo število kopij ciljnega gena v primerjavi z negativno kontrolo ter rezultate primerjali z nukleaznim testom Cel-I.



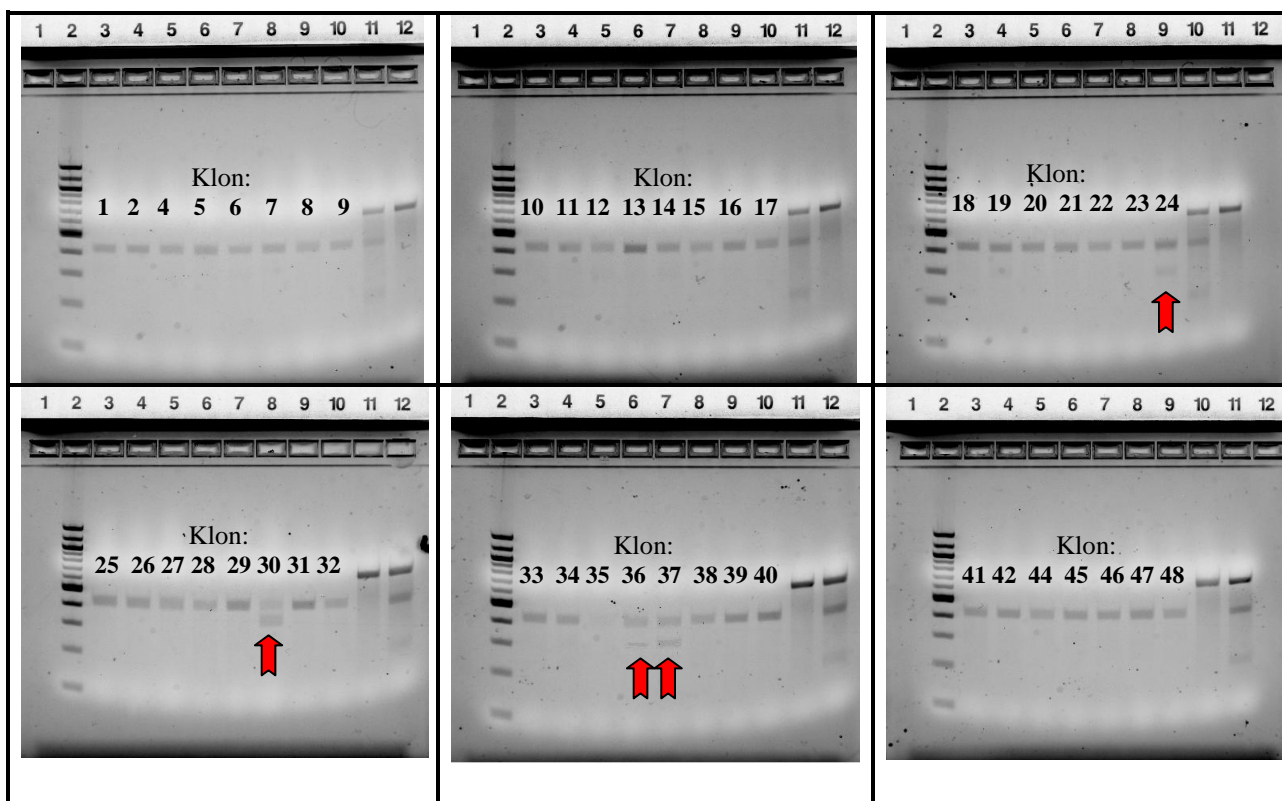
Slika 31: Primerjava števil kopij ciljnega gena pri mešani populaciji

Graf zgoraj prikazuje primerjavo števila kopij ciljnega gena negativne kontrole in mešane populacije celične linije CHO *Der2*, ki je bila transficirani s pDNA ZFN.

Z obema metodama, nukleaznim testom Cel-I in qPCR, smo pridobili primerljive rezultate, zato smo se odločili, da bomo za analizo klonov uporabili metodo qPCR, nukleazni test Cel-I pa samo na nekaj klonih, in rezultate primerjali.

3.3.2 Rezultati analize zaznavanja mutacij pri klonih celične linije CHO *Der2* z nukleaznim testom Cel-I

Postopek zaznave mutacij ciljnega gena z nukleaznim testom Cel-I smo začeli z namnoževanjem PCR-produkta z izbranim parom začetnih oligonukleotidov. Ustreznost velikosti PCR-produktov smo preverili na agaroznem gelu. Rezultati preverjanja velikosti PCR-produktov niso vključeni. Po postopku hibridizacije in obdelavi z nukleazo Surveyor smo uspešnost delovanja ZFN, torej nastanek mutacije na ciljnem genu, preverili z analizo fragementov na agaroznem gelu.



Slika 32: Rezultati nukleaznega testa Cel-I na ravni klonov

Z nukleaznim testom Cel-I smo analizirali PCR-produkte prvih 48 klonov, pridobljenih iz celične linije CHO *Der2*. Nanosi na e-gel: steza 2: standard velikosti 100 bp; steze od 3 do 10: vzorci (glej zaporedne številke klonov pod slikami e-gela); stezi 11 in 12: kontroli Surveyor C + G in C.

Po analizi PCR-produktov z nukleaznim testom Cel-I so pri nekaterih vzorcih pod PCR-produktom pričakovane velikosti prisotni dodatni fragmenti (na sliki 32 so označeni z rdečo puščico: ↑).

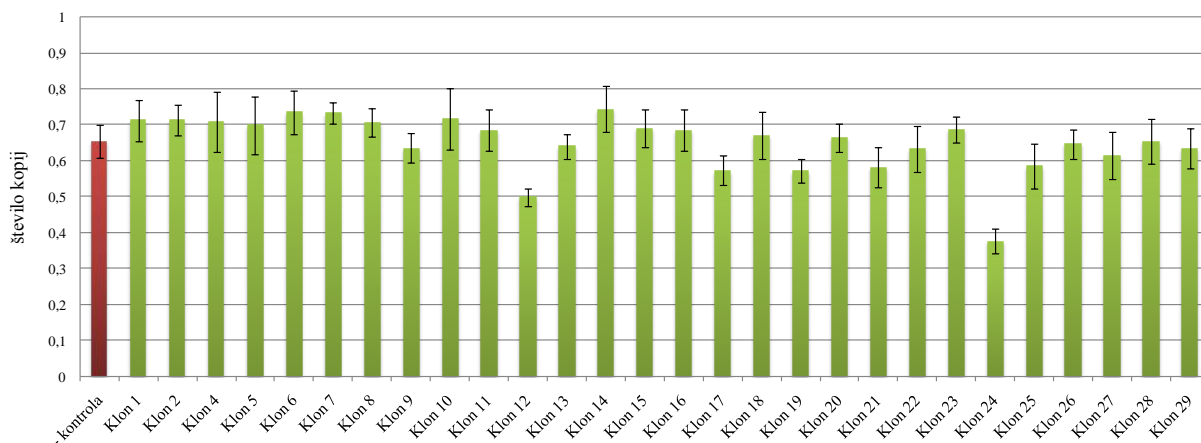
Dodatni fragmenti so prisotni pri klonih z oznakami 24, 30, 36 in 37. Dodaten fragment je nastal zaradi uspešno rezanih heterodupleksov, ki so nastali ob hibridizaciji PCR-produkta in so bili tretirani z *nukleazo Surveyor*. Kontrolni C + G in C potrjujeta uspešnost postopka hibridizacije in tretiranja z *nukleazo Surveyor*.

Postopek zaznave mutacij z nukleaznim testom Cel-I (*Surveyor mutation detection kit*) smo opravili na 48 klonih celične linije CHO *Der2*. Enake vzorce smo analizirali z metodo qPCR. Z obema metodama smo pridobili enake rezultate (nastanek mutacije smo identificirali pri enakih klonih – glej sliki 33 in 34).

Zaradi večje preprostosti izvedbe in majšega obsega laboratorijskega dela smo za nadaljnje analize uporabili metodo qPCR.

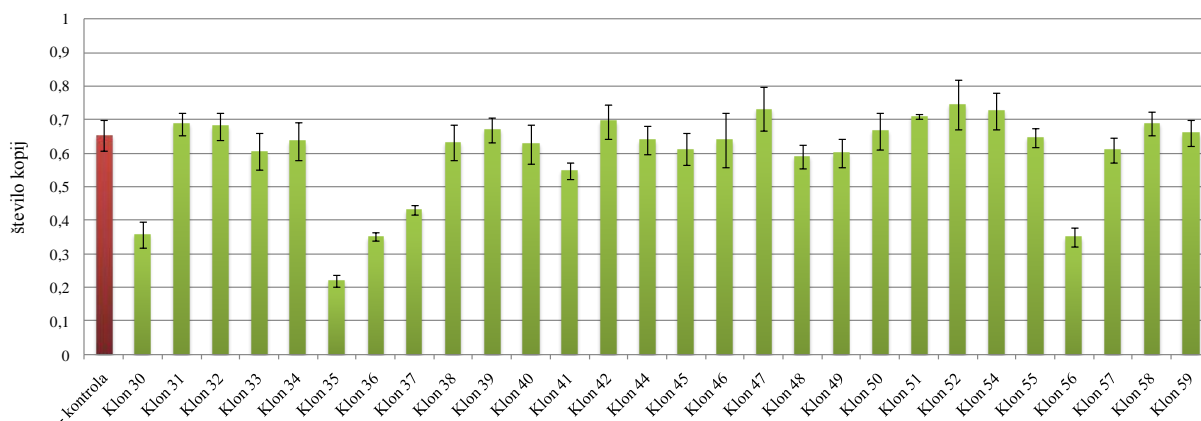
3.4 REZULTATI ANALIZE ZAZNAVANJA MUTACIJ PRI KLONIH CELIČNIH LINIJ CHO DER2 IN CHO DER3 S QPCR

Uspešnost delovanja nukleaz z motivi cinkovih prstov na klonih, prodboljenih iz celičnih linij CHO *Der2* in CHO *Der3*, smo preverili z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR). Izolirali smo gDNA vsakega posameznega klona in ga umerili na izhodno koncentracijo 100 ng/ μ L. Po analizi s qPCR smo iz standardne krivulje odčitali število kopij referenčnega gena (GLUC) in ciljnega gena v vzorcu ter izračunali razmerje med njima. Na ta način smo določili število kopij ciljnega gena na haploidni genom celice. V primeru delovanja nukleaze z motivi cinkovih prstov na ciljni gen se število kopij ciljnega gena v vzorcu zniža oz. amplifikacije ne zaznamo.



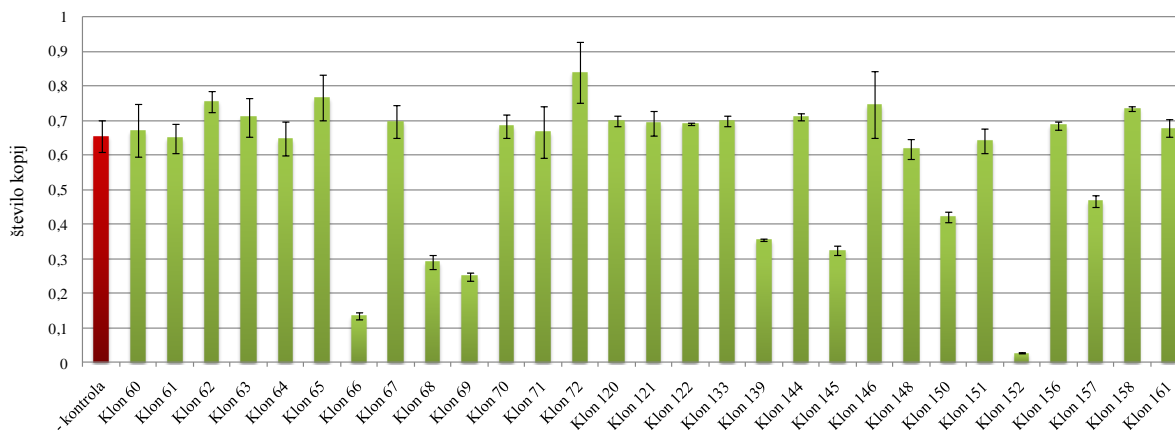
Slika 33: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 1. do 29. derivata celične linije CHO *Der2*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



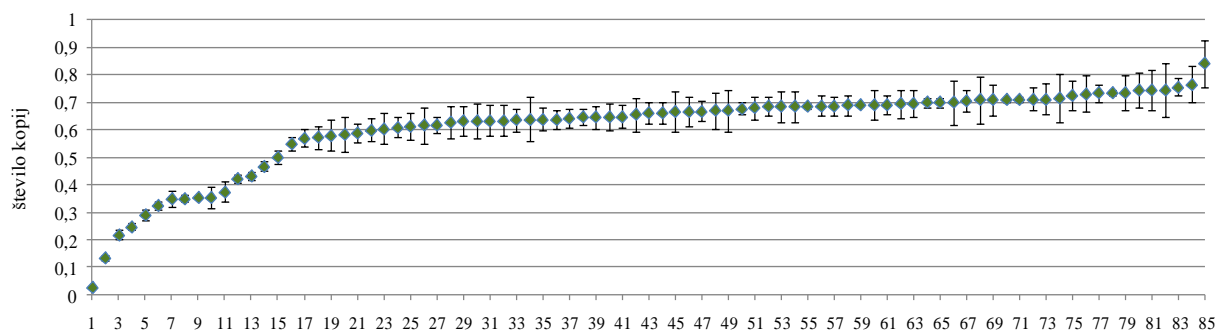
Slika 34: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 30. do 59. derivata celične linije CHO *Der2*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



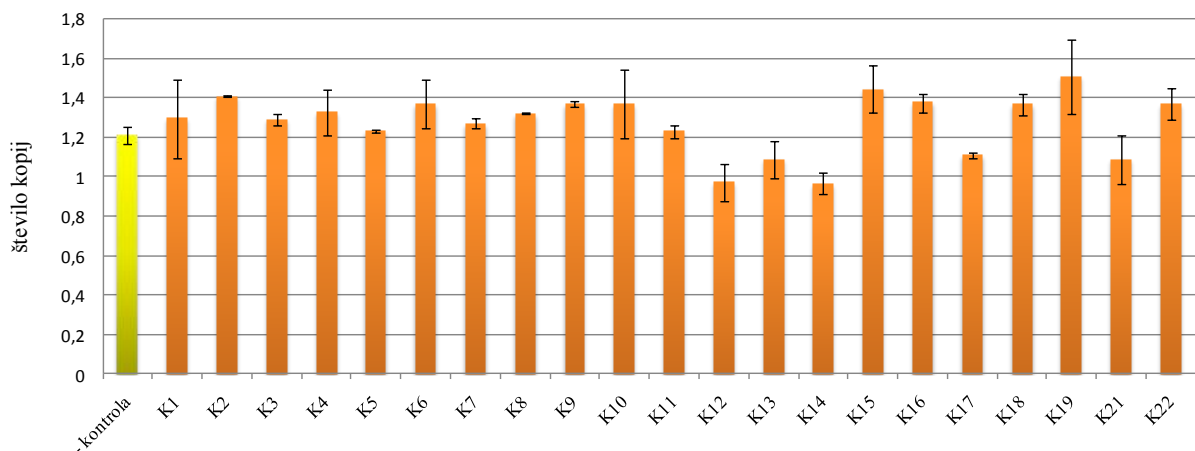
Slika 35: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 60. do 161. derivata celične linije CHO
Der2

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



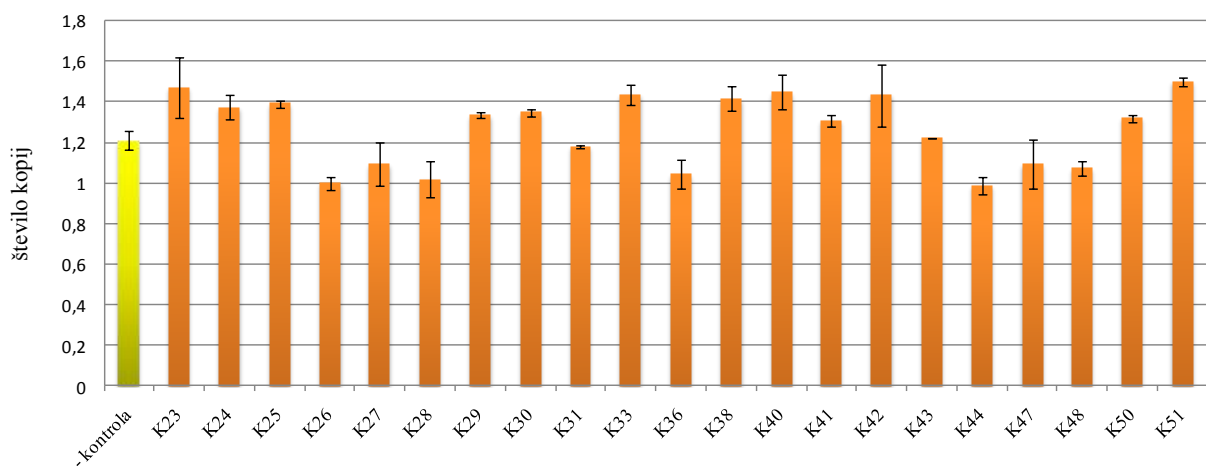
Slika 36: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in vseh 85 klonov derivata celične linije CHO *Der2*

Rezultati na sliki 36 so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo in v naraščajočem vrstnem redu števila kopij kot povprečje dveh tehničnih ponovitev s standardno deviacijo.



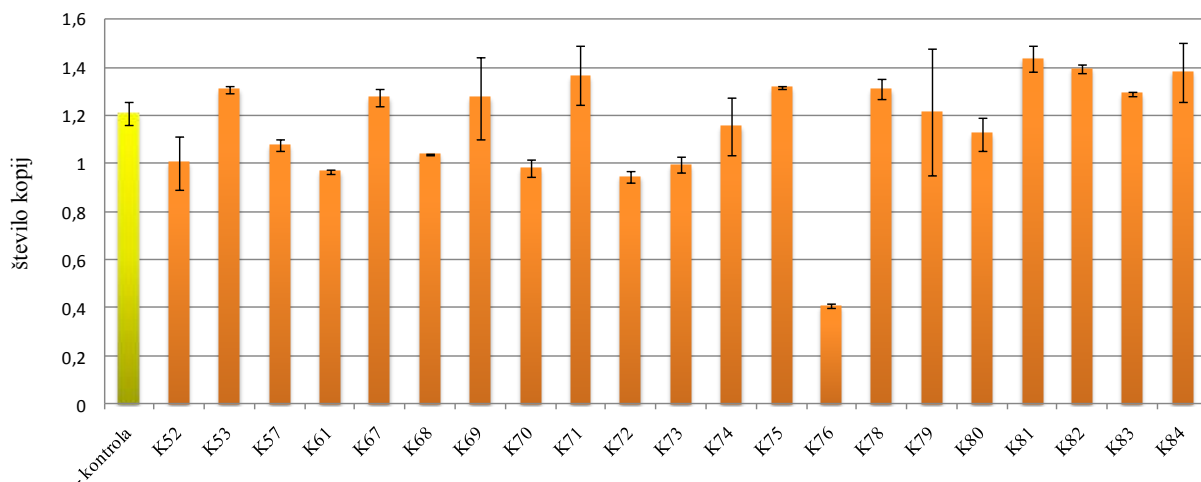
Slika 37: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 1. do 22. derivata celične linije CHO *Der3*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



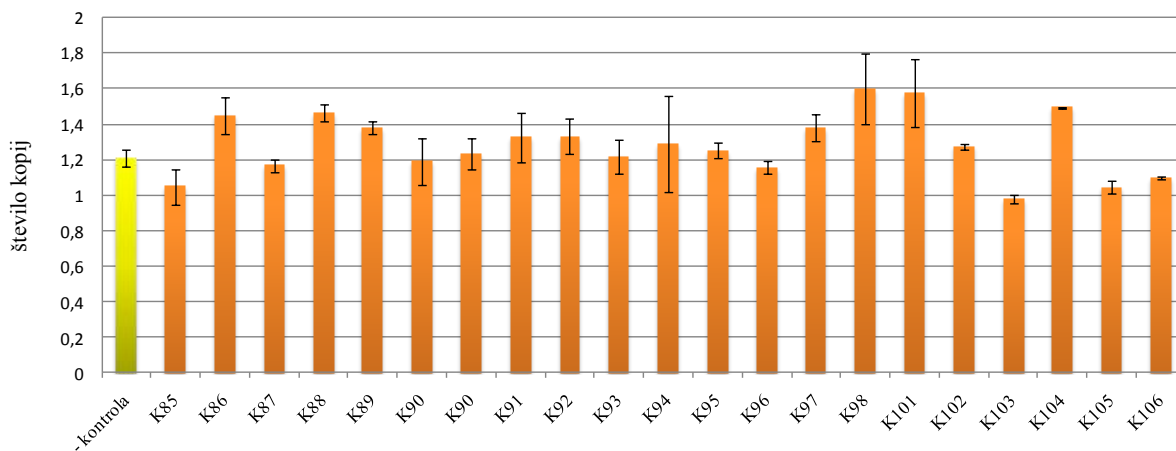
Slika 38: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 23. do 51. derivata celične linije CHO *Der3*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



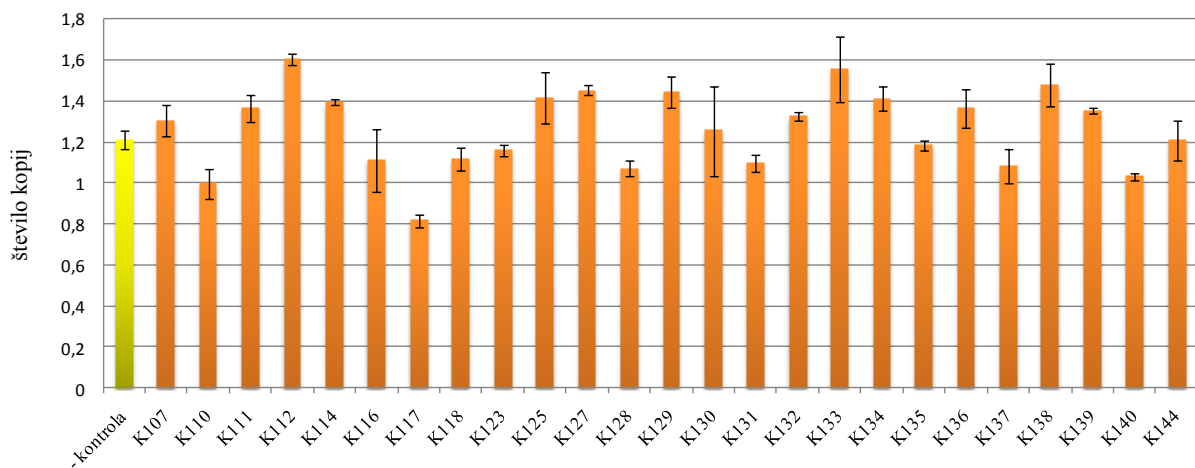
Slika 39: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 52. do 84. derivata celične linije CHO *Der3*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



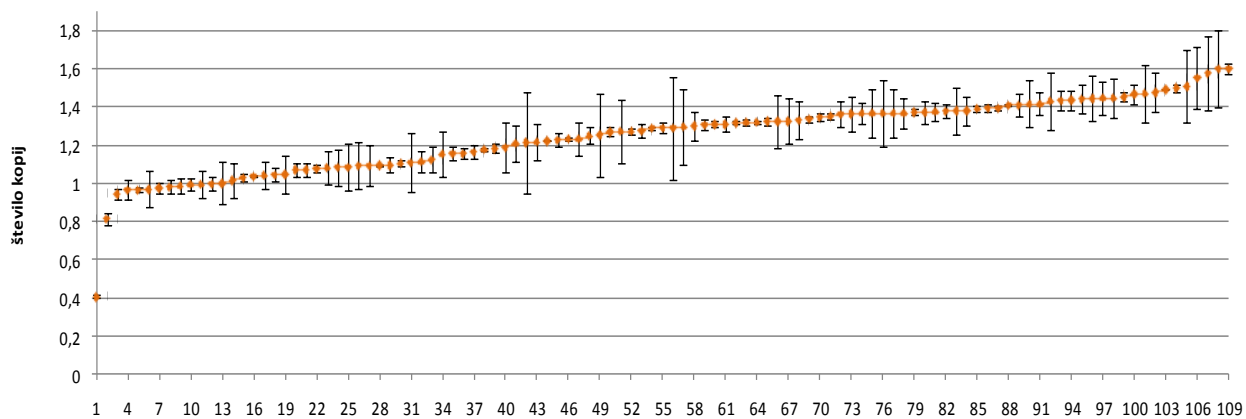
Slika 40: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 85. do 106. derivata celične linije CHO
Der3

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



Slika 41: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in klonov od 107. do 144. derivata celične linije CHO
Der3

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo.



Slika 42: Rezultati števila kopij ciljnega gena – kontrole in vseh 109 klonov derivata celične linije CHO *Der3*

Rezultati so prikazani kot povprečje dveh ponovitev s standardno deviacijo in v naraščajočem vrstnem redu števila kopij kot povprečje dveh tehničnih ponovitev s standardno deviacijo.

4 RAZPRAVA

Modifikacija posttranslacijskih poti v sesalskih celicah je v zadnjih dveh desetletjih naredila velik napredek v proizvodnji rekombinantnih proteinov. Ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO) omogočajo posttranslacijske modifikacije rekombinantnih proteinov, ki so kompatibilni in bioaktivni v ljudeh (Kim in sod., 2012). Zato so celice CHO vodilni produkcijski organizem v proizvodnji biološko podobnih zdravil, še vedno pa so potrebne optimizacije pogojev gojenja, ki omogočajo visoko produktivnost celic in visoko učinkovitost zdravil (Warner, 1999). Velik izziv pri doseganju podobnosti biološkim zdravilom na ravni posttranslacijskih modifikacij omogoča genetska modifikacija, s katero znižamo izražanje ali popolnoma uničimo gen za strukturo, ki jo hočemo na biološko podobnemu zdravilu spremeniti (Werner in sod., 2007).

Z uporabo različnih orodij genetskega modificiranja lahko različno vplivamo na posttranslacijske modifikacije. Z uporabo npr. RNAi se začasno utiša izražanje ciljnega gena, kar pomeni, da dosežemo le prehodni učinek (Warner, 1999). Pri uporabi metode izbivanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov (ZFN) s trajno spremembo ciljnega gena dosežemo stabilno prenašanje modifikacije v naslednje generacije (Warner, 1999). Uporaba metode izbivanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov je v zadnjih 10 letih omogočila stabilen genetski vpliv na ravni gDNA. Mestno specifične dvojne prelome na DNA omogoči specifična vezava nukleaze z motivi cinkovih prstov. Prelomi se v celici popravijo z nehomolognim združevanjem koncev, popravljalnim mehanizmom, ki je naravno prisoten v celici (Urnov in sod., 2010). Med popravljanjem se lahko del genske informacije izgubi, kar povzroči premik bralnega okvirja ali delecijo kritičnih aminokislin. Metoda nukleaz z motivi cinkovih prstov je bila že večkrat uporabljena pri celični liniji CHO, kar opisujejo številni uspešni poskusi: izbitje gena za dihidrofolat reduktazo pri 2–3 % vseh celic (Santiago in sod., 2008); izbitje genov za α -1,6-fukoziltransferazo (Santiago in sod., 2008); izbitje skupine treh genov – za glutamin sintazo, dihidrofolat reduktazo in α -1,6-fukoziltransferazo (Liu in sod., 2010).

Namen magistrskega dela je bil vrednotenje uspešnosti izbivanja genov z nukleazo z motivi cinkovih prstov v dveh derivatih celičnih linij ovarijskih celic kitajskega hrčka, CHO *Der2* in CHO *Der3*, ki ju uporabljamo za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Celični liniji se razlikujeta v ploidnosti (CHO *Der2* je diploidna in CHO *Der3* triploidna), kar smo upoštevali kot dodaten parameter pri vrednotenju uspešnosti izbivanja genov. Po vnosu plazmidne DNA za ZFN v celice se ta vgradi v genom celice. Izražanje kompleksa ZFN je konstantno. Za nastanek reza na dvoverižni DNA morata dimerizirati dve podenoti nukleaze. Motivi cinkovih prstov navadno prepoznajo 18 specifičnih nukleotidov, kar naj bi zagotavljalo dovolj visoko specifičnost vezave in povzročitev dvojnih prelomov ciljnega gena na želenem mestu (Durai in sod., 2005).

Nukleaze z motivi cinkovih prstov so na podlagi nukleotidnega zaporedja hrčkovega gena (*C. Griseus*) za ciljni gen, katerega imena in nukleotidnega zaporedja zaradi tehnološko-komercialnih razlogov ne moremo razkriti, načrtovali v podjetju Sigma. Prejeli smo plazmidni DNA z oznakami pDNA ZFN 1 in pDNA ZFN 2 (prva prepozna smiselni del in druga protismiselni del vijačnice DNA). Obe plazmidni DNA smo v laboratoriju namnožili in izolirali iz bakterije *E. coli*. Namnoženo in originalno plazmidno DNA smo fragmentirali z restrikcijskimi encimi in ujemanje restrikcijskega vzorca preverili na agaroznem gelu. Nato smo namnoženo plazmidno DNA zaradi lažjega vstavljanja v genom in s tem izražanja genov za ZFN linearizirali ter uspešnost linearizacije preverili na agaroznem gelu.

Po postopku odmrzovanja parentalnih celičnih linij smo celice gojili v rastnih platenkah pri kontroliranih pogojih gojenja (37 °C, 10 % CO₂, 110 rpm). Po odmrzovanju se rast celic ni razlikovala med celičnima linijama. Gostoto in delež živih celic smo 3-krat na teden vzorčili s pomočjo aparature Vi-Cell in takoj po dosegu višjega števila živih celic (≥ 70 %) opravili transfekcije z linearizirano plazmidno DNA (3 μ g pDNA ZFN 1 + 3 μ g pDNA ZFN 2). Za namen preverjanja uspešnosti transfekcij smo po dve paralelki obeh celičnih linij uporabili za kontroli. Prvo smo transficirali z zelenofluorescirajočim proteinom; GFP (označena kot » + kontrola«), pri drugi pa nismo uporabili vektorja; slepa kontrola (označena kot » – kontrola«). Kontroli smo po 48 urah medsebojno primerjali na pretočnem citometru in potrdili uspešnost

transfekcij. Tri dni po transfekcijah smo preverili učinkovitost delovanja nukleaz z motivi cinkovih prstov na ravni mešane populacije celic («pool») v primerjavi z negativno kontrolo (– kontrola). Najprej smo izolirali genomsko DNA celic mešane populacije z uporabo avtomatiziranega sistema za izolacijo DNA (QiaCube), spektrofotometrično določili koncentracijo nukleinskih kislin ter učinek transfekcij preverili z uporabo nukleaznega testa Cel-I in kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR).

Nukleazni test Cel-I (Surveyor Mutation Detection Kit) se večinoma uporablja za identifikacijo klonov, pri katerih pride do izbijanja genov z ZFN (Santiago in sod., 2008; Liu in sod., 2010). Nukleazni test Cel-I obsega tri korake: 1. Pomnoževanje regije s ciljnim genom, 2. Hibridizacijo PCR-produkta, 3. Obdelavo z *nukleazo Surveyor*. Pred začetkom testa smo najprej optimizirali PCR za pomnoževanje regije na gDNA s ciljnim genom, pri katerem pričakujemo mutacijo kot posledico delovanja ZFN. V programu VectorNTI smo oblikovali različne začetne oligonukleotide, katerih PCR-produkt se je razlikoval v dolžini nukleotidnega zaporedja. Po preračunu teoretičnih temperatur prileganja začetnih oligonukleotidov smo optimizacijo PCR opravili pri temperaturah prileganja med 50 in 70 °C. Pri optimizaciji smo uporabili izolirano gDNA parentalnih celičnih linij CHO *Der2* in CHO *Der3*. Zaradi specifičnosti pomnoževanja pri izbrani temperaturi prileganja 60,5 °C (brez nespecifičnih fragmentov, zaznanih na elektroforeznem gelu) smo oligonukleotidni par 4 izbrali tudi zaradi dolžine PCR-produkta (427 baznih parov). Domnevali smo, da bo po obdelavi z *nukleazo Surveyor* prišlo ločljivost fragmentov na agaroznem gelu boljša. Med hibridizacijo PCR-produkta pri fragmentih z mutacijami nastanejo heterodupleksi, ki jih *nukleaza Surveyor* prepozna in jih razcepi na mestu neujemanja. Če *nukleaza Surveyor* reže le en alel heterodupleksov, na elektroforeznem gelu poleg nerezanega alela detektiramo dva dodatna krajša fragmenta, ki skupaj ustrezata dolžini nerezanega alela. V primeru reza obeh alelov na elektroforeznem gelu detektiramo le dva krajša fragmenta.

Uporaba nukleaznega testa Cel-I zahteva veliko laboratorijskega dela, saj je večstopenjski postopek časovno zelo dolgotrajen (po izolaciji gDNA so potrebni amplifikacija s PCR, preverjanje z elektroforezo, hibridizacija, obdelava z *nukleazo Surveyor* ponovno preverjanje

na elektroforeznem gelu). Odločili smo se, da bi uspešnost izbivanja genov večjega števila vorcev hitreje ovrednotili z metodo qPCR, saj po izolaciji gDNA vzorce takoj analiziramo. Rezultate nukleaznega testa Cel-I in metode qPCR na ravni mešane populacije celic »poolov« in na ravni manjšega števila »klonov« bi primerjali in ob morebitnih primerljivih rezultatih qPCR uporabili za nadaljnje analize generirane populacije klonov. O možnosti uporabe qPCR za identifikacijo klonov z uspešno izbitimi geni poročajo tudi Hansen in sodelavci (2012). Začetne oligonukleotide za qPCR smo načrtovali tako, da sonda prilega na prepoznavnem mestu nukleaze, na katerem naj bi nastal rez na tarčni DNA. Specifičnost sonde je zelo velika in v primeru neujemanja v enem samem nukleotidu ni njene vezave na tarčno DNA. V primeru modifikacije obeh alelov ciljnega gena torej ne zaznamo amplifikacije po analizi s qPCR, v primeru modifikacije enega alela pa je amplifikacija zmanjšana. Standardno krivuljo smo generirali tako, da smo glede na izhodno koncentracijo referenčnih vzorcev (gDNA CHO *Der1*) izračunali število kopij endogenega gena (GLUC) v različnih razredčinah z upoštevanjem velikosti genoma kitajskega hrčka (*Cicetulus griseus*). Število kopij ciljnega gena, ki smo ga določili v vzorcu, smo delili s številom kopij endogenega gena v vzorcu in tako dobili število kopij ciljnega gena na haploidni genom celice.

Primerjavo obeh metod vrednotenja izbivanja ciljnega gena smo izvedli na ravni mešane populacije celic CHO *Der3* transficirane s pDNA ZFN. Pri vrednotenju z metodo qPCR je opazno znižanje števila kopij ciljnega gena za ~ 30 % v primerjavi s številom kopij ciljnega gena pri negativnih kontrolah (netransficirane CHO *Der3*). Z nukleaznim testom Cel-I smo na elektroforeznem gelu opazili razlike med negativno kontrolo in vzorcem, transficiranim s pDNA ZFN, saj so bili pri zadnjem opazni dodatni fragmenti v velikosti rezanih heterodupleksov pričakovanih velikosti 300 in 127 bp. Ker so bili rezultati primerljivi, smo se odločili, da bomo testa prav tako primerjali na manjšem številu vzorcev na ravni »klonov«. Menili smo, da nam bo s postopkom kloniranja in analizo večjega števila kolonij posamezne celične linije uspelo detektirati delež kolonij s popolnim uničenjem ciljnega gena.

Po preverjanju na stopnji mešanih populacij smo četrty dan po transfekcijah oz. delovanju kompleksa ZFN opravili postopek kloniranja. Mešano populacijo celic smo redčili in jo

nacepili v poltrden rasten medij. Po desetih dneh inkubacije (37 °C, 10 % CO₂) smo nastale kolonije z uporabo avtomatiziranega klonirnega robota (ClonePix) prenesli v tekoči rastni medij v mikrotitrskih ploščicah s 96 jamicami. Gojenje posameznih kolonij smo nadaljevali s prenosom v mikrotitrskeske ploščice s 24 in 6 jamicami, vse do rastnih plastenek. S slikanjem mikrotitrskih ploščic (Clone Select Imager) smo določali primernost klonov za prenos iz ploščic s 96 jamicami v 24-, iz 24- v 6-, iz 6- v rastne plastenke. Z meritvami gostote celic (celic/ml) v rastnih plastenkah smo preračunali zadostno količino celic za izolacijo gDNA. Za izolacijo smo uporabili avtomatizirani sistem za izoalacije iz tkivnih kultur (QiaCube). Izolirani gDNA smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo, vse vzorce umerili na 100 ng/μl in do analize shranili pri -20 °C.

S kloniranjem nam je uspelo pridobiti 85 klonov celične linije CHO *Der2* in 109 klonov celične linije CHO *Der3*. Glede na število kopij ciljnega gena smo s tretiranjem z nukleazami z motivi cinkovih prstov dosegli le delno znižanje. Pri nobeni celični liniji nismo zaznali klona s popolnoma izbitim genom. Pri osmih klonih celične linije CHO *Der2*, kar pomeni 10 % vseh analiziranih klonov, se je znižalo število kopij približno za 50 %. Klona K66 (znižanje števila kopij na 25 %) in K152 (znižanje na 10 %) sta najbližje izbitemu ciljnemu genu. Rezultati pri celični liniji CHO *Der3* so zaradi triploidnosti slabši. Pri devetih klonih, kar pomeni 10 % analiziranih klonov, se je znižalo število kopij ciljnega gena na 60 %, pri klonu K76 pa je znižanje števila kopij na 40 %. Da smo dosegli le delno uničenje gena, pomeni, da se je najverjetneje okvaril en alel – kar smo v nadaljevanju potrdili tudi z nukleaznim testom Cel-I. Glede na rezultate številnih avtorjev, da je učinkovitost izbivanja genov, ki so v celici v eni kopiji, večinoma 1 % (Santiago in sod., 2008; Liu in sod., 2010; Klug, 2010) in lahko dosega 5 % (Malphettes in sod., 2010), bi za klon s popolnoma izbitim ciljnim genom najverjetneje morali pripraviti in analizirati večje število klonov, še posebno v primeru triploidne celične linije. Santiago in sod. (2008) so analizirali 360 klonov, Malphettes in sod. (2010) poročajo o testiranju 711 klonov, Cost in sod. (2010) so pregledali približno 600 klonov in Liu in sod. (2010) 666 klonov. Vsi avtorji pa so dosegli > 1 % učinkovitost izbivanja za posamezni gen. Za potrditev rezultatov, pridobljenih s qPCR, smo v začetnih fazah nekatere klone celične linije CHO *Der2* testirali tudi z uporabo nukleaznega testa Cel-I in pridobili primerljive

rezultate. Pri klonih z oznakami K24, K30, K36 in K37 lahko na agaroznem gelu vidimo prisotni dodatni lisi, kar pomeni, da se je okvaril le en alel ciljnega gena.

Ciljnega gena nam ni uspelo izbiti pri nobeni celični liniji. Uspešno smo pripravili celično linijo z znižano ravno ciljnega gena tako, da smo ciljni gen delno modificirali, saj smo zaznali manjšo amplifikacijo po analizi s qPCR. Preureditev DNA bi nedvoumno lahko dokazali s sekveniranjem obeh alelov ciljnega gena. Pri tem bi lahko uporabili Sangerjevo metodo (kloniranje PCR-produktov v plazmid in namnoževanje v *E.coli*) ali sekveniranje nove generacije (analiza PCR-produktov posameznih klonov).

Laboratorijsko delo bi lahko nadaljevali v smeri povečanja učinkovitosti izbivanja ciljnega gena z nukleazo z motivi cinkovih prstov. Na izbranih klonih z najnižjim številom kopij ciljnega gena bi ponovili postopek transfekcij s plazmidno DNA za nukleazo z motivi cinkovih prstov. Popolno izbitje ciljnega gena bi lahko poskusili tudi s transfekcijami ZFN mRNA. V primerjavi z ZFN pDNA ne pride do integracije v genom, posledično ni stalnega izražanja, s čimer se izognemo mogočemu nespecifičnemu delovanju kompleksa ZFN. mRNA bi pripravili z *in vitro* transkripcijo plazmidne DNA. Po transfekciji celic in postopku kloniranja bi z metodo qPCR ovrednotili uspešnost ZFN na podlagi števila kopij ciljnega gena, lahko pa bi testirali tudi njegovo prisotnost prek izražanja mRNA (*angl.* gene expression) z uporabo različnih referenčnih genov.

Ker smo med nalogo uporabili celice, ki niso vsebovale genov za biološko zdravilo, bi za potrditev ustrezne modifikacije ciljnega gena, ki je vpleten v posttranslacijske modifikacije, morali identificirati klone po transfekciji s plazmidnim vektorjem za rekombinantno telo.

S testiranjem orodij za zaznavo mutacij smo vzpostavili aplikativno metodo za hitro identifikacijo klonov s pomočjo qPCR. Zaradi preprostosti in natančnosti metode je mogoče identificirati veliko populacijo klonov ter hitro ovrednotiti uspešnost modifikacije genoma. S testiranjem pristopov genetske modifikacije ciljnega gena smo pridobili izkušnje za uspešno načrtovanje in hitro identifikacijo genetsko modificiranih celičnih linij.

5 SKLEPI

- Nukleaze z motivi cinkovih prstov so eno izmed primernih molekularnih orodij za izbivanje ciljnih genov pri sesalskih celicah.
- Z uporabo nukleaze z motivi cinkovih prstov nam je uspelo izbiti en alel ciljnega gena pri dveh celičnih linijah CHO *Der2* in CHO *Der3*. Celična linija CHO *Der2* je diploidna, CHO *Der3* pa triploidna, zato je popolno izbitje gena pri zadnji še manj verjetno.
- Metoda qPCR je zaradi natančnosti primerna za vrednotenje izbivanja genov z nukleazami z motivi cinkovih prstov. Ker postopek obsega manj laboratorijskega dela, je metoda veliko hitrejša kot nukleazni test Cel-I.

6 POVZETEK

Biološka zdravila so večinoma odvisna od posttranslacijskih modifikacij, v katere je vključenih veliko različnih celičnih proteinov. Z modifikacijo genov se ukvarja veliko strokovnjakov, zaradi preproste genetske modifikacije pa pri tem uporabljajo ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO). Z načrtnim izničenjem genov, ki pripomorejo k nastanku neželenih struktur, lahko izboljšamo varnost in učinkovitost biološkega zdravila. Namen magistrskega dela je bil generirati populacijo klonov in vrednotiti uspešnost delovanja tehnologije nukleaz z motivi cinkovih prstov (ZFN) na ciljni gen, ki ga zaradi tehnološko-komercialnih razlogov ne smemo razkriti, pri različnih derivatih CHO-celic. Plazmidno DNA z zapisom za nukleazo z motivi cinkovih prstov smo po linearizaciji transficirali v dva derivata celic CHO celic (CHO *Der2* in CHO *Der3*). Kompleks ZFN se je v celicah izrazil v obliki aktivnega proteina, ki se s pomočjo motivov cinkovih prstov specifično veže na ciljno nukleotidno zaporedje in na mestu vezave povzroči prelome vijačnice DNA. Poškodbe sprožijo popravljalne mehanizme, kot sta nehomologno združevanje koncev in homologna rekombinacija. Pri večjih spremembah gena, kot so insercije, delecije ali preurejanja nukleotidnega zaporedja, se premakne bralni okvir in posledično ne izrazi protein. Pri mešani populaciji smo z metodo nukleaznega testa Cel-I preverili prisotnost mutacij, z metodo qPCR pa ocenili število kopij ciljnega gena v primerjavi s starševsko celično linijo. Po primerjavi rezultatov smo ugotovili, da sta metodi nukleazni test Cel-I in qPCR primerljivi in da lahko zadnja preprosto nadomesti nukleazni test Cel-I po generiranju večjega števila klonov, kar smo tudi storili zaradi obsežnejšega obsega dela, ki ga je treba opraviti za obdelavo vseh vzorcev z nukleaznim testom. Po postopku kloniranja smo vrednotenje izbivanja genov ponovili na ravni klonov in ugotovili, da nam ni uspelo povsem izbiti ciljnega gena pri nobeni celični liniji. V 10 % klonov posamezne celične linije smo uspešno vplivali na del ciljnega gena – en alel, drugi del pa se je še izražal. Delovanje nukleaz z motivi cinkovih prstov je bilo učinkovitejše pri celični liniji CHO *Der2* kot pri CHO *Der3*, ker je prva celična linija diploidna. Čeprav nismo povsem uničili ciljnega gena, je metoda ZFN ena izmed primernih molekularnih orodij za izbivanje ciljnih genov pri sesalskih celicah. qPCR je zaradi natančnosti zaznave, točnosti rezultatov, ki so primerljivi z rezultati

nukleaznega testa Cel-I, in manjšega obsega laboratorijskega dela najprimernejša metoda za vrednotenje izbivanja genov.

7 VIRI

- Amarzguioui M., Rossi J.J., Kim D. 2005. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Letters*, 26: 5974–5981
- Applied biosystems. 2004. Real-time PCR systems, 7900HT Fast Real-time PCR system and 7300/7500 Fast real-time PCR systems: Chemistry guide. Carlsbad, Life Technologies: 3–50
- Bannasser in sod. 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 22: 607–619
- Baulcombe D. 2007. Molecular biology, Amplified silencing. *Science*, 315, 5809: 199–200
- Biowire. Sigma bioengineering. Genome by design by Hongyi Zhang and Nathan Zenser. 2010: 5–11, 14, 15
- Buchon N., Vaury C. 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*, 96, 2: 195–202
- Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., Dearmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M., Weissmann C. 1992. Normal Development and Behavior of Mice Lacking the Neuronal Cell-Surface Prp Protein. *Nature*, 356, 6370: 577–582
- Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 3: 283–291
- Carroll, D. 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188, 4: 773–782
- Choo Y., Sanchez-Garcia I., Klug A. 1994. In vivo repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature*, 372, 6507: 642–645
- Dolar M. 2007. Sestavljeno genetsko stikalo, blog. <http://novebiologije.blogspot.com/2007/07/sestavljeno-genetsko-stikalo.html> (julij 2014)

- Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M. H., Chandrasegaran S., 2005. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33, 18: 5978–5990
- Durocher Y., Butler M. 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 6: 700–707
- Guo J., Gaj T., Barbas III C. F., 2010. Directed Evolution of an Enhanced and Highly Efficient FokI Cleavage Domain for Zinc Finger Nucleases. *Journal of Molecular Biology*, 400: 96–107
- Hansen K., Coussens M.J., Sago J., Subramanian S., Gjoka M., Briner D. 2012. Genome editing with CompoZr custom zinc finger nucleases (ZFNs). *Journal of Visualized Experiments*, 14, 64: 3304
- Hoshaw J. P., Unger-Wallace E., Zhang F., Voytas D. F. 2010. A transient assay for monitoring zinc finger nuclease activity at endogenous plant gene targets. *Methods in Molecular Biology*, 649: 299–313
- Jablonka E., Lamb M. J. 2009. Štiri razsežnosti evolucije, 1. izdaja. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 443 str.
- Jamiri. 2007. Mikroskopisches Bild von CHO-Zellen in Suspension. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4f/Cells.jpg> (julij 2014)
- Jiang Z., Huang Y., Sharfstein S.T. 2006. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnology Progress*, 22, 1: 313–318
- John H. A., Brinstiel M. L., Jones K. W. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582–857

- Kielberg V. 2010. Cryopreservation of mammalian Cells – protocols. Thermo scientific. 17 str.
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3: 1156–1160
- Klug A. 2010. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43, 1: 1–21
- Kroll J., Kliner S., Schneider C., Voß I., Steinbüchel A. 2010. Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 3, 6: 634–657
- Kuchta T. 2006. Polymerase chain reaction as a method for food analysis V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (ur.). Bratislava, VUP Research Institute: 13–25
- Lee Y., Nakahara K., Pham J., Kim K., He Z., Sontheimer E., Carthew R., 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117, 1: 69–81
- Lewin B. 2000. *Genes VII*. Oxford, Oxford University Press Inc.: 990 str.
- Liu P. Q., Chan E.M., Cost G. J., Zhang L., Wang J.B., Miller J.C., Guschin D.Y., Reik A., Holmes M.C., Mott J.E. and others. 2010. Generation of a Triple-Gene Knockout Mammalian Cell Line Using Engineered Zinc-Finger Nucleases. *Biotechnology and Bioengineering*, 106, 1: 97–105
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190–212
- Mackay J., Landt O., 2007. Real-time PCR fluorescent chemistries, *Methods in molecular biology*, 353: 237–261

- Malphettes L., Freyvert Y., Chang J., Liu P.Q., Chan E., Miller J.C., Zhou Z., Nguyen T., Tsai C., Snowden A.W., Collingwood T.N., Gregory P.D., Cost G.J. 2010. Highly Efficient Deletion of FUT8 in CHO Cell Lines Using Zinc-Finger Nucleases Yields Cells That Produce Completely Nonfucosylated Antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 106: 774–783
- McManus M.T., Sharp P.A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics*, 3, 10: 737–747
- Minafra L., Bravata V. 2014. Cell and molecular response to IORT treatment. *Translational Cancer Research*, 3, 1: 37–46
- Omasa T., Onitsuka M., Kim W. D. 2010. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 3: 233–240
- Pathan I. B., Setty C. M. 2009. Chemical penetration enhancers for ransdermal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical research*, 8, 2: 173–179
- Patten C.L., Glick B.R., Pasternak J. 2009. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington, ASM Press: 1018 str.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002–2007
- Pingoud A., Alves J., Geiger R. 1993. *Restriction Enzymes: Enzymes of Molecular Biology. Methods in Molecular Biology*. Totowa, Humana Press, 5, 16: 107–200
- Porteus M.H., Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 23, 8: 967–973
- Prusiner S.B., Groth D., Serban A., Koehler R., Foster D., Torchia M., Burton D., Yang S. L., DeArmond S. J. 1993. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and

facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 22: 10608–10612

Qiu P., Shandilya H., D'Alessio J. M., O'Connor K., Durocher J., Gerard G.F. 2004. Mutation detection using SurveyorTM nuclease. *BioTechniques*, 36: 702–707

Rhodes D., Klug A. 1993. Zinc finger structure. *Scientific American*, 268, 4: 32–39

Sailer A., Bueler H., Fischer M., Aguzzi A., Weissmann C. 1994. No Propagation of Prions in Mice Devoid of Prp. *Cell*, 77, 7: 967–968

Santiago Y., Chan E., Liu P. Q., Orlando S., Zhang L., Urnov F. D., Holmes M. C., Guschin D., Waite A., Miller J. C., Rebar E. J., Gregory P. D., Klug A., Collingwood T. N. 2008. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 15: 5809–5814

Sauders N. A. 2004. Quantitative real-time PCR. V: *Real-time PCR: an essential guide*. Edward K., Logan J., Sauders N. A. Wymnondham, Horizon Bioscience: 103–124

Sheila A. Stewart in sod., 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi primary cells. *RNA*, 9, 4: 493–501

Shin C. S., Hong M. S., Bae C. S., Lee J. 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, 13, 3: 249–257

Suresh R., Young-Hoon K., Hyongbum K. 2013. Stability of Zinc Finger Nuclease Protein is Enhanced by the Proteasome Inhibitor MG132. *Plos One*, 8, 1: 69–81

Štrukelj B., Kos J., 2007. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*; 1. izdaja. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.

Urnov F.D, Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11, 9: 636–646

Warner T.G., 1999. Enhancing therapeutic glycoprotein production in Chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting. *Glycobiology*, 9, 9: 841–850

Watson J.D. 2007. *Recombinant DNA: genes and genomes: a short course*. San Francisco, W. H. Freeman: 474 str.

Werner R.G., Kopp K., Schlueter M. 2007. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica supplement*, 96, 455: 17–22

Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 11: 1393–1398

Yang B., Wen X., Kodali N.S., Oleykowski C.A., Miller C.G., Kulinski J., Besack D., Yeung J.A., Kowalski D., Yeung A. T. 2000. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry*, 39, 13: 3533–3541

ZAHVALA

Iskrena hvala Mihaeli Škulj za nesebično pomoč in strokovne nasvete tako v laboratoriju kot pri pisanju naloge. V čast mi je, da sem lahko magistrsko delo opravljal s tvojo pomočjo.

Najlepše se zahvaljujem delovnemu mentorju Dominiku Gaserju, zaradi katerega je magistrsko delo tako dobro.

Prav tako bi se rad zahvalil mentorju Gregorju Anderluhu in recenzetki Darji Žgur Bertok za hitro odzivnost in vse opombe, ki so pomagale izboljšati magistrsko delo.

Ne smem pozabiti svojih sodelavcev na oddelku Celična in molekularna biologija Biofarmaceutike farmacevtske družbe Lek, d. d., ki so mi med obsežnim laboratorijskim delom vedno stali ob strani.

Nazadnje pa gre zahvala mojim najbližjim za vso spodbudo v času celotnega študija, še posebej hvala moji Darji.